



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Instituto de Microbiologia

Resistência total à vancomicina em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* tipo-VanA: Uma revisão de 2016

Vasco Antunes de Oliveira Tiago

Julho'2017



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Instituto de Microbiologia

Resistência total à vancomicina em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* tipo-VanA: Uma revisão de 2016

Vasco Antunes de Oliveira Tiago

Orientado por:

Professor Doutor José Augusto Gamito Melo Cristino

Julho'2017

Este estudo pretende rever a literatura existente relativamente a VRSA (segundo a classificação do CLSI) e *Staphylococcus aureus* tipo-VanA em todo o Mundo. Embora ambos os termos tenham sobreposição significativa, existem diferenças importantes. Os artigos relevantes foram pesquisados nos motores de busca Google Académico e PubMed, tendo sido excluídos os artigos originais não indexados na Web of Science e os estudos negativos para o isolamento de estirpes VRSA. Após a descrição do primeiro caso, em 2002 nos EUA, seguiram-se vários outros casos, principalmente em países asiáticos, mas a maioria do conhecimento sobre estas estirpes provém da caracterização minuciosa das 16 estirpes americanas confirmadas. Apesar de tudo VRSA parece ser ainda um organismo extremamente raro e o potencial para vir a tornar-se um problema comum é desconhecido. Estas estirpes surgem quando há transferência do operão *vanA* de uma estirpe VRE para uma estirpe receptora de *Staphylococcus aureus*, que passa então a produzir precursores de peptidoglicano modificados aos quais a vancomicina se liga com uma afinidade muito baixa. A sua emergência parece exigir condições cuja conjugação é extremamente rara e, mesmo quando estas estirpes surgem e causam infecção, geralmente tem havido várias opções para tratar tais infecções com sucesso. O diagnóstico laboratorial destas estirpes é relativamente simples, mas pode ser dificultado pela utilização de métodos considerados inválidos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistente; *Staphylococcus aureus* tipo-VanA; VRSA.

The present study is aimed at reviewing the existing literature on VRSA (after the CLSI classification) and VanA-type *Staphylococcus aureus* around the World. Even though both terms show significant overlap, there are important differences. The relevant papers were retrieved from the Google Scholar and PubMed search engines; those not indexed on Web of Science, as well as those reporting none VRSA strain isolated, have been excluded. Since the first case report, which happened in 2002 in the USA, several other cases have been published, most of them in Asian countries, but most of the current knowledge on these strains is derived from the careful description of the 16 confirmed American isolates. Nevertheless, VRSA still seems to be an extremely rare organism, and the potential for it to become a common problem is unknown. These strains emerge when a *vanA* operon from a VRE strain is transferred to a receptor *Staphylococcus aureus* strain, which begins producing modified peptidoglycan precursors with a dramatically lower binding affinity to vancomycin. Such an emergence seems to demand a certain set of conditions, the combination of which is extremely rare. Even when these strains emerge and cause infection, in general there have been several options left to treat such infections with success. Laboratory diagnosis is relatively straightforward, but may be hindered by the use of non-validated methods.

Keywords: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*; VanA-type *Staphylococcus aureus*; VRSA.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

Siglas: CC, Complexo clonal (*clonal cluster*); CDC, Centers for Disease Control and Prevention; CIM, Concentração inibitória mínima; CFU, Unidades formadoras de colónia (*colony-forming units*); CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; DM, Diabetes *mellitus*; DRC, Doença renal crónica; DVP, Doença vascular periférica; EUA, Estados Unidos da América; EUCAST, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; HLR, Resistência de alto nível (*high-level resistance*); HTA, Hipertensão arterial sistémica; hVISA, Hétero-VISA; LLR, Resistência de baixo nível (*low-level resistance*); MRSA, *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (*meticillin-resistant Staphylococcus aureus*); NARSA, Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*; PCR, Reacção em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*); PBP, Proteína de ligação à penicilina (*penicillin-binding protein*); PFGE, Electroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*); SCN, Estafilococos coagulase-negativos; ST, Tipo de sequência (*sequence type*); TSA, Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos; VISA, *Staphylococcus aureus* vancomicina-intermédio (*vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*); VRE, *Enterococcus* vancomicina-resistente (*vancomycin-resistant Enterococcus*); VRSA, *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistente (*vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*); VSSA; *Staphylococcus aureus* vancomicina-susceptível (*vancomycin-susceptible Staphylococcus aureus*).

Introdução.....	5
Métodos	6
Definições.....	6
Pesquisa de Resistência à Vancomicina em <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	7
Gelose de Rastreio com Vancomicina	7
Método de Kirby-Bauer	7
Métodos Automatizados	8
Métodos Moleculares.....	8
Métodos Colorimétricos	8
hVISA	9
VISA.....	9
Casos Reportados de Isolamento de VRSA	10
Estados Unidos da América.....	10
Ásia	15
Irão	15
Índia.....	16
Paquistão	17
Extremo Oriente	17
África	18
Brasil.....	18
Europa.....	18
Fenótipo VanA em <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Mecanismo de Resistência.....	19
Precusores de Peptidoglicano Modificados	20
Antagonismo entre Resistência à Vancomicina e Meticilina	20
Custo Biológico da Expressão do Operão VanA.....	21
Estirpes VRSA Vancomicina-Dependentes.....	21
Variabilidade da Expressão de Resistência	22
Estirpes VRSA Não-Tipo-VanA	23
Transferência de Genes de Resistência de <i>Enterococcus</i> para <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Mecanismos de Integração dos Genes de Resistência	24
Plasmídeos Enterocócicos Tipo-Inc18.....	26
Plasmídeos Estafilocócicos Tipo-pSK41	26
Co-Colonização com Organismos Precusores de VRSA	27

Recepção de Material Genético por <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Emergência de VRSA no Meio Ambiente.....	29
Tratamento da Infecção por VRSA	29
Lipopéptidos	29
Oxazolidinonas	30
Cefalosporinas Anti-MRSA.....	30
Lipoglicopéptidos	30
Tetraciclinas e Glicilciclinas.....	30
Quinupristina/Dalfopristina	31
Outros Fármacos	31
Terapêuticas em Estudo	31
Novos Alvos	32
Prevenção da Transmissão	33
Vigilância Epidemiológica	34
Perspectivas Futuras	34
Conclusão	36
Referências Bibliográficas.....	37

Introdução

Staphylococcus aureus é um dos agentes mais frequentemente encontrados na prática clínica, sendo responsável por uma grande parte das infecções mais graves. É da maior importância que tenhamos armas eficazes prontamente disponíveis para combater tais infecções, mas cada vez mais este organismo surge em formas resistentes a vários fármacos aos quais previamente era susceptível, diminuindo significativamente o conjunto de opções a que podemos recorrer.

A penicilina era a primeira linha até ao aparecimento¹ e subsequente disseminação das estirpes produtoras de penicilinas. Começaram então a ser usadas as isoxazolilpenicilinas, resistentes à acção das penicilinas, o grupo ao qual pertence a meticilina, mas em 1961 surgiram as primeiras estirpes resistentes a este grupo, MRSA². A mutação das PBP2 para PBP2a tornou estas estirpes resistentes a todos os β -lactâmicos disponíveis no mercado³ durante largos anos, até ao lançamento recente das cefalosporinas anti-MRSA^{4,5}. Entretanto a meticilina deixou de ser comercializada, mas as isoxazolilpenicilinas como a flucloxacilina continuam a ser agentes de primeira linha contra as estirpes meticilina-sensíveis. Em Portugal, contudo, MRSA é um problema muito importante, correspondendo a cerca de 50% das estirpes (um dos números mais elevados a nível europeu), embora a sua prevalência pareça estar a diminuir⁶.

A primeira linha de tratamento das estirpes MRSA tem sido – e continua a ser – a vancomicina, mas o seu lugar pode estar em risco. Recentemente tem-se observado em várias estirpes o “deslizamento da CIM” (*MIC creep*), um aumento ligeiro (1-2 mg/L) mas importante da CIM para a vancomicina, embora ainda dentro do intervalo de susceptibilidade⁷. Adicionado à fraca actividade bactericida da vancomicina, este fenómeno pode tornar muitas estirpes tolerantes, uma vez que o melhor preditor da actividade da vancomicina é a razão entre a área sob a curva da concentração em função do tempo e a CIM⁷. Além disso, nas últimas duas décadas temos assistido à emergência de estirpes resistentes à vancomicina. Observam-se dois grandes padrões de resistência: um padrão de resistência intermédia (VISA) e um padrão de resistência total (VRSA). Define-se ainda um subtipo de VISA, chamado hVISA, que apresenta hétero-resistência intermédia. Na presente revisão focar-se-á VRSA (segundo a classificação do CLSI) e *Staphylococcus aureus* tipo-VanA em detalhe. Ambos os termos têm sobreposição significativa, mas, embora o operão *vanA* seja o principal mediador da resistência total à vancomicina, já foram descritas estirpes VRSA *vanA*-negativas, bem como estirpes *vanA*-positivas não-VRSA.

A transferência de material genético entre *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*, hoje reconhecidamente central na emergência de VRSA, foi verificada experimentalmente a partir dos anos 80⁸⁻¹⁰. Apenas em 1992, contudo, se verificaria a possibilidade da emergência de estirpes VRSA tipo-VanA, quando Noble *et al*¹¹ conseguiram, em laboratório, a transferência por conjugação dos genes de resistência à vancomicina de *Enterococcus faecalis* para *Staphylococcus aureus*. Mais dez anos passariam até ao isolamento da primeira estirpe VRSA clínica, na cidade de Detroit, EUA¹².

Métodos

Os artigos que servem de fundamento para o estudo actual foram obtidos através de pesquisa pelo Google Académico e PubMed, em Dezembro de 2016, pelas palavras-chave “*vanA*”; “vancomycin”; “resistant” ou “resistance”; e “*Staphylococcus aureus*”. Outros artigos elegíveis foram encontrados através das referências bibliográficas. Apenas foi usado material de acesso gratuito conforme fornecido pela Universidade de Lisboa. Todos os artigos originais não indexados na Web of Science (com a excepção de dois artigos relevantes para a correcção do texto), bem como os estudos em que não se isolou qualquer estirpe VRSA, foram excluídos.

Definições

Até 2006 o CLSI definia resistência total à vancomicina por uma CIM ≥ 32 mg/L, enquanto as estirpes com CIM de 8-16 mg/L eram consideradas intermedicamente resistentes¹³. Vários casos de insucesso terapêutico onde não seria expectável levaram à criação de pontos de corte mais baixos¹⁴, definindo-se resistência total por uma CIM ≥ 16 mg/L e resistência intermédia por uma CIM 4-8 mg/L. Estirpes com CIM ≤ 2 mg/L são consideradas susceptíveis¹⁴⁻¹⁶. Esta alteração não aumenta significativamente o diagnóstico de estirpes resistentes, mas parece aumentar o valor preditivo do resultado da susceptibilidade à vancomicina¹⁴.

Dentro da resistência total, distingue-se ainda entre estirpes resistentes de alto (HLR-VRSA) e baixo nível (LLR-VRSA), embora não existam pontos de corte definidos para esta distinção¹⁷. Esta classificação é usada principalmente para as estirpes americanas, LLR-VRSA correspondendo a VRS2 e VRS3a e HLR-VRSA correspondendo a todas as outras isoladas até à data.

As recomendações do EUCAST estão em vigor nos laboratórios portugueses desde 2014¹⁸. Em comum com as recomendações do CLSI, o EUCAST recomenda que seja determinada a CIM, mas considera que uma CIM de 2 mg/L é o limite superior da susceptibilidade e que qualquer valor superior corresponde a uma estirpe resistente¹⁹. Por esse motivo importa referir que o termo “VRSA” será sempre usado neste trabalho em acordo com a classificação do CLSI.

As estirpes hVISA, achados relativamente mais comuns, são aparentemente os precursores que geram estirpes VISA após exposição à vancomicina²⁰, que contêm subpopulações de células-filha intermedicamente resistentes com uma frequência de $1/10^5$ a $1/10^6$, mas em que as células-mãe são susceptíveis²¹.

Pesquisa de Resistência à Vancomicina em *Staphylococcus aureus*

O método de referência na pesquisa de resistência à vancomicina é a determinação da CIM por diluição¹⁶ ou microdiluição em tubo^{19,22}, mas muitos laboratórios recorrem a outras técnicas mais rápidas e simples, embora por vezes inadequadas e com resultados menos fiáveis^{23,24}. Além de conhecer os métodos apropriados, todos os laboratórios devem desenvolver o seu próprio procedimento para a detecção de VRSA²², tal

como o clínico deve conhecer o método de pesquisa da susceptibilidade à vancomicina no Laboratório com que trabalha²⁵. É muito importante identificar rapidamente estas estirpes, não só para prevenir o insucesso terapêutico mas também para evitar efeitos deletérios causados pela presença de vancomicina em concentrações subinibitórias²⁶⁻²⁹.

Todas as estirpes não-susceptíveis são consideradas incomuns, pelo que devem ser guardadas até que, por métodos válidos, se tenha confirmado a CIM, a espécie e a pureza da cultura. Após a confirmação a comissão de controlo de infecção deve ser notificada e a estirpe enviada para um laboratório de referência para confirmar o fenótipo^{18,22}.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A CIM para a vancomicina deve ser determinada para todas as estirpes de *Staphylococcus aureus*, após 24 horas de incubação^{16,19,22}. Recomenda-se a diluição¹⁶ ou microdiluição em tubo^{19,22} com caldo de Mueller-Hinton ajustado para catiões ou diluição em gelose com meio de Mueller-Hinton¹⁶.

O ϵ -test, embora aparente uma fiabilidade algo reduzida na detecção de VISA³⁰, parece ser uma boa opção na identificação de VRSA, incluindo estirpes LLR-VRSA^{31,32}. Parece sobrestimar a CIM^{23,33}, pelo que pode ser um melhor preditor da eficácia da terapêutica com vancomicina que a diluição em tubo^{7,24}, além de ser suficientemente rápido para orientar o tratamento⁷. No CDC este teste também é usado na confirmação de VRSA²².

GELOSE DE RASTREIO COM VANCOMICINA

Segundo as orientações do CLSI¹⁶, o rastreio de *Staphylococcus aureus* com CIM para vancomicina de pelo menos 8 mg/L deve ser feito pela inoculação de uma placa de gelose Brain-Heart com 6 µg/mL de vancomicina, a partir de um inóculo de 0,5 McFarland. Deve ser colocada uma gota de 10 µL na superfície da gelose, ou pode inocular-se uma área determinada da placa com zaragatoa. Este método é pouco sensível para a identificação de estirpes com CIM de 4 mg/L^{16,22,23}, mas pode ser o mais conveniente para identificar VRSA rapidamente^{25,34}. Até oito estirpes podem ser testadas em simultâneo numa única placa, que pode ser preparada pelo próprio laboratório mas que, por questões de qualidade, deve ser preferivelmente adquirida comercialmente²². As placas devem ser incubadas durante 24 horas¹⁶. O crescimento de mais de uma colónia indica presuntivamente susceptibilidade reduzida à vancomicina e exige a determinação da CIM por um método validado.

MÉTODO DE KIRBY-BAUER

Antes da exclusão deste método como inapropriado para a detecção de resistência^{16,19} o CLSI recomendava a sua utilização como método de rastreio¹⁵. Era utilizado um disco com 30 µg de vancomicina; após 24 horas de incubação em meio de Mueller-Hinton uma estirpe presumivelmente susceptível era definida por um halo

de inibição com pelo menos 15 mm de diâmetro. Nas estirpes com halos menores deveria ser determinada a CIM com um método de referência para confirmar o fenótipo¹⁵.

Rapidamente após o aparecimento das primeiras estirpes VISA se tornou evidente que este método não as distingue de VSSA^{16,23,30}. Este teste muitas vezes falha na detecção de qualquer nível de resistência, com a excepção do fenótipo HLR mediado pelo operão *vanA*⁷, e mesmo essas estirpes podem apresentar resultados invulgares que dificultam a sua interpretação^{21,35}.

Desde 2009 o CLSI considera o método de Kirby-Bauer inválido para o diagnóstico de susceptibilidade à vancomicina em *Staphylococcus aureus*^{23,36}.

MÉTODOS AUTOMATIZADOS

Alguns métodos automáticos também falham em quantificar exactamente a resistência da estirpe, seja intermédia ou total^{21,23,25,30,31,37-39}. Ao longo do tempo os fabricantes introduziram melhorias que aumentaram a sua capacidade de diagnóstico, embora a acuidade ainda não seja a ideal⁴⁰, e não permita ainda detectar uma CIM aumentada dentro da gama da susceptibilidade⁷. Hoje em dia é consensual que a CIM determinada é na maioria dos casos suficientemente próxima da CIM real para identificar correctamente uma estirpe como VRSA^{22,23,34,37,39}, embora sejam possíveis falsos positivos pela inclusão de estirpes VISA²². É importante confirmar um resultado de resistência por um método de referência.

MÉTODOS MOLECULARES

A presença do operão *vanA* apenas pode ser determinada por métodos moleculares. Nos EUA, o CDC examina por PCR todas as estirpes VRSA confirmadas²². Contudo, vários grupos têm desenvolvido métodos diversos para a pesquisa do gene *vanA*. Em 2004 Depardieu *et al*⁴¹ criaram um método de PCR múltipla capaz de identificar os vários genes *van* em várias espécies de *Enterococcus* e *Staphylococcus* que, em simultâneo, identifica estes genes em VRSA e exclui a contaminação por *Enterococcus* spp.. Este método revelou ser bastante preciso na amplificação dos vários alvos utilizados, tendo sido também eficaz na detecção do gene *vanA* em estirpes mais recentes⁴²⁻⁴⁴.

Mais tarde, outros grupos criaram outros métodos, mas todos eles incapazes de excluir a contaminação da amostra por enterococos. Estes incluem dois métodos de hibridização molecular^{45,46} e um outro método de PCR múltipla⁴⁷.

MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Coban *et al*⁴⁸ descreveram dois métodos colorimétricos para a detecção rápida de resistência à vancomicina: um com aplicação de resazurina e um ensaio de nitrato redutase. Apesar de uma precisão algo reduzida, estes testes aparentaram ser fiáveis para rastreio, e podem vir a constituir alternativas eficazes, rápidas, baratas e potencialmente automatizáveis, e eventualmente chegar à prática clínica de rotina.

hVISA

Apesar dos desenvolvimentos no diagnóstico de VISA e VRSA, ainda não existe um método prático e eficaz para utilizar por rotina na pesquisa de hVISA¹⁴, nem estão desenvolvidos métodos moleculares para tal fim²⁴. Sendo testadas por métodos convencionais, estas estirpes são reportadas pelo Laboratório de Microbiologia como susceptíveis à vancomicina²⁵, uma vez que a CIM não parece correlacionar-se com a presença de hétero-resistência¹⁴. O melhor método disponível é a análise populacional²⁰, mas é demorada e tecnicamente exigente²⁴. Existe um método modificado⁴⁹ muito eficaz, amplamente usado no contexto da investigação¹⁴, mas também não tem lugar na prática clínica diária. O macro- ϵ -test, uma variante do ϵ -test que utiliza um inóculo de 2 McFarland e 48 horas de incubação, é uma forma barata e fiável para a detecção de hVISA, mas não permite determinar uma CIM fiável²¹. Existem ainda outras alternativas, mas com sensibilidades variáveis⁵⁰. A identificação de uma estirpe hVISA, embora importante para a predição do sucesso terapêutico, continua a ser um desafio¹⁴.

VISA

Antes de qualquer publicação sobre um isolamento clínico de *Staphylococcus aureus* com qualquer grau de resistência à vancomicina foram descritos alguns mutantes laboratoriais com resistência intermédia⁵¹, e até mesmo total⁵², após várias passagens em meio de cultura com vancomicina, mas com um mecanismo de resistência diferente dos fenótipos *van* de *Enterococcus* spp.. Em 1996 uma destas estirpes foi isolada num hospital japonês⁵³. A esta estirpe chamou-se Mu50, e esta manteve-se como a estirpe VISA prototípica. A primeira estirpe hVISA reportada, chamada Mu3 (a estirpe hVISA prototípica), foi isolada no mesmo hospital, no mesmo ano, e apresentava um padrão de PFGE semelhante ao de Mu50²⁰. O primeiro caso conhecido de infecção por VISA, contudo, ocorreu em França, em 1995⁵⁴.

O estudo detalhado destas estirpes sugeriu que a resistência intermédia se deveria à produção de uma parede celular invulgarmente espessa, com maior número de precursores de peptidoglicano, de modo a absorver uma quantidade maior de moléculas de vancomicina até que esta atingisse a bactéria em quantidades suficientes para ter efeito^{52,53,55,56}. Também se notou que nestas estirpes existe uma inibição da separação celular^{52,55,56}, bem como um aumento da renovação da parede celular durante a pressão com vancomicina, diminuindo ainda mais o seu efeito⁵⁵.

Foram rapidamente reportadas várias estirpes VISA e hVISA de várias partes do Mundo após a publicação dos casos japoneses. Não se verificou que os genes *van*, encontrados nas estirpes VRE, estivessem envolvidos no mecanismo de resistência²⁵. Em Portugal o primeiro isolamento de VISA ocorreu em 2006, num hospital de Braga⁵⁷.

Uma explicação detalhada sobre as estirpes VISA está fora do contexto da revisão actual e pode ser encontrada na **Referência 50**.

Casos Reportados de Isolamento de VRSA

Até à data existem vários casos reportados de infecção e colonização por VRSA por todo o Mundo. Alguns casos minuciosamente descritos e caracterizados foram reportados nos EUA^{12,13,32; 58-61}, Portugal⁶², Brasil^{63,64}, Índia⁶⁵, Irão^{66,67} e Paquistão⁶⁸. A caracterização molecular destas estirpes está explicitada na **Tabela 1**, de acordo com a ordem apresentada no texto. Estes casos demonstram que VRSA tem aparecido em várias partes do Mundo. É muito provável que existam vários outros casos reais que nunca tenham sido notados ou reportados, inclusivamente prévios ao primeiro caso reportado, mas o facto é que as estirpes detalhadamente descritas são ainda muito escassas. As estirpes aqui descritas não são todas as reportadas: muitos estudos descrevendo estirpes VRSA foram excluídos por não se encontrarem indexados na Web of Science. Salvo indicação em contrário, as estirpes aqui descritas foram identificadas por métodos validados.

A maioria das estirpes VRSA reportadas foi detectada em estudos de prevalência de VRSA ou estudos dos padrões locais de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus*. A maioria dos estudos em que de facto foram encontradas estirpes VRSA foi levada a cabo em países asiáticos. Muitos destes recorreram a métodos validados^{16,19} para a identificação destas estirpes. No entanto, no estudo actual é certo que, pelos métodos empregues na pesquisa de artigos científicos, existe um viés na amostra de artigos relativos aos padrões locais de resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus*, com tendência para a sobrestimação da prevalência real destas estirpes. Por esse motivo opta-se por não avançar com dados relativos a tal prevalência.

Uma característica notável nas infecções por VRSA é o tipo de infecções a que estas estirpes estão associadas. A larga maioria destas estirpes foi isolada em feridas crónicas e outras infecções da pele e tecidos moles, em doentes com múltiplas morbilidades, notavelmente DM e DRC, e a mortalidade e morbilidade atribuíveis a estas infecções são relativamente reduzidas¹³.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA

Após o aparecimento das primeiras estirpes VISA nos EUA, foi fundada a NARSA, que estabeleceu e mantém um repositório de estirpes caracterizadas, disponíveis para serem acedidas e usadas por cientistas interessados²⁵. Um achado interessante neste país é a localização relativamente restrita dos isolamentos. Oito dos 10 primeiros casos confirmados ocorreram no estado do Michigan. Após a identificação do último desses, os 4 casos confirmados seguintes ocorreram todos no estado de Delaware, de onde nenhum caso tinha sido reportado antes. O CDC confirmou o isolamento de um total de 16 estirpes VRSA nestes 14 casos, todas positivas por PCR para os genes *vanA* e *mecA*. Além destes 14 casos, existem pelo menos mais 4 estirpes VRSA reportadas neste país, duas na Pensilvânia⁸¹ e duas em Nova Iorque⁸². Estas quatro estirpes não foram caracterizadas, pelo que é desconhecido se o fenótipo VRSA foi confirmado por métodos de

referência. No contexto do terceiro caso foram ainda isoladas três estirpes VISA *vanA*-positivas, embora essas estirpes pareçam ser variantes de VRS3a com um grau de resistência mais baixo.

As características clínicas de cada um destes casos estão resumidas na **Tabela 2**.

A primeira estirpe VRSA detectada no Mundo, VRS1, foi isolada em Junho de 2002 na cidade de Detroit, Michigan¹², de uma doente com 40 anos de idade com múltiplas morbilidades. Vários cursos de antibioticoterapia foram administrados no contexto de ulceração crónica das extremidades inferiores por neuropatia diabética, alguns dos quais incluíam vancomicina^{12,35}. Em Abril de 2002 um dos dedos do pé foi amputado por gangrena; a doente subsequentemente desenvolveu bacteriémia por MRSA causada por um enxerto arteriovenoso de hemodiálise infectado. A doente foi tratada com vancomicina e rifampicina e o enxerto foi substituído por um catéter temporário, que foi depois removido por infecção por MRSA. Foi colocado um segundo, que depois foi substituído por um terceiro que infectou em Junho; as culturas da ponta do catéter revelaram MR-VRSA e VR-*Enterococcus faecalis*³⁵. A infecção parecia resolvida uma semana após a remoção do catéter, mas duas úlceras plantares foram avaliadas por suspeita de infecção; as culturas revelaram VRSA, VR-*Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca* e *Candida albicans*. A doente foi tratada com sucesso com co-trimoxazol, metronidazol e tratamento agressivo da ferida, incluindo desbridamento cirúrgico quando necessário^{12,35}.

A segunda estirpe VRSA, inicialmente chamada HMC3 (VRS2)⁸⁷, foi detectada no Centro Médico de Hershey, na Pensilvânia, em Setembro de 2002. Um doente de 70 anos foi internado por uma úlcera calcaneana crónica com possível osteomielite^{31,58}. Uma cultura da úlcera foi positiva para MRSA, mas não *Enterococcus* spp.. No entanto, era conhecido o estado de co-colonização por VRE e MRSA, embora a espécie de VRE não tenha sido identificada⁷⁴. A possibilidade de resistência à vancomicina foi inicialmente levantada pelo método de Kirby-Bauer e por uma placa de rastreio com vancomicina, e posteriormente confirmada por ϵ -test^{31,58,74}. A infecção parecia estar a resolver, mas o doente acabou por falecer devido às comorbilidades¹³.

A terceira estirpe VRSA foi detectada em Março de 2004, em Nova Iorque. Esta estirpe, chamada VRSA 595 (VRS3a), foi isolada da urina de uma doente de 63 anos com tubo de nefrostomia que apresentava um biofilme polimicrobiano³⁸, embora o teste inicial com métodos automáticos tenha falhado em detectar a resistência³². Também foram isoladas três estirpes VISA *vanA*-positivas³⁸. Um derivado de VRSA 595, VRSA 5734 (VRS3b), isolado 4 semanas mais tarde no mesmo local anatómico, apresentava uma CIM para a vancomicina consistentemente mais elevada e estável³⁸. Apesar do tratamento as culturas para VRSA foram persistentemente positivas e a doente acabou por falecer num internamento em Abril de 2005¹³.

Os casos americanos 4 a 10 ocorreram todos no Michigan e encontram-se descritos na **Tabela 2**. VRS11a e VRS11b, isoladas em conjunto^{85,86}, foram as primeiras a ser encontradas no estado de Delaware. VRS11b é uma variante de VRS11a constitutivamente resistente à vancomicina, enquanto VRS11a é vancomicina-dependente e indutivelmente resistente⁴⁴.

NOMES	LINHAGEM	LOCALIZAÇÃO, ANO	CIM (mg/L)	DADOR VRE MAIS PROVÁVEL	LOCAL ANATÔMICO	Inc18-TIPO EM VRE/VRSA
VRS1; VRSA-1; MI-1; MI-VRSA	USA100, CC5	Michigan, 2002	1024	<i>E. faecalis</i> (mesmas amostras)	Ponta de catéter, úlcera plantar	Apenas VRE
VRS2; HMC3; VRSA-2; PA-2; PA-VRSA	USA100, CC5	Pensilvânia, 2002	32	Não esclarecido	Úlcera calcaneana	NA em VRE, negativo em VRSA
VRS3a; VRSA-3a; VRSA 595; NY-3	USA800, CC5	Nova Iorque, 2004	64	<i>E. faecium</i> (mesma amostra)	Urina e tubo de nefrostomia	Não (VRE possui plasmídeo conjugativo)
VRS3b; VRSA-3b; VRSA 5734	USA800, CC5	Nova Iorque, 2004	> 128	<i>E. faecium</i> (mesmo local anatômico)	Urina	ND
VRSA-4; VRSA-4; MI-4	USA100, CC5	Michigan, 2005	256	<i>E. faecalis</i> (cultura rectal)	Ferida com gangrena num dedo do pé	Ambos
VRS5; VRSA-5; MI-5	USA100, CC5	Michigan, 2005	512	<i>E. faecalis</i> (mesma amostra)	Ferida cirúrgica (paniclectomia e reparação de hérnia abdominal)	Ambos
VRS6; VRSA-6; MI-6	USA100, CC5	Michigan, 2005	1024	<i>E. faecalis</i> , <i>E. avium</i> (mesma amostra)	Úlceras plantares	Apenas VRE (ambos)
VRS7; VRSA-7; MI-7	USA100, CC5	Michigan, 2006	512 (VD, MS)	Não isolado	Ferida de fasciite necrotizante	NA em VRE, positivo em VRSA
VRS8; VRSA-8; MI-8	USA100, CC5	Michigan, 2007	1024	Não isolado	Ferida plantar	NA em VRE, negativo em VRSA
VRS9; VRSA-9; MI-9	USA100, CC5	Michigan, 2007	1024 (VD, MS)	<i>E. faecalis</i> (mesma amostra)	Ferida plantar	Não
VRS10; VRSA-10; MI-10	USA100, CC5	Michigan, 2009	> 256	<i>E. gallinarum</i> (cultura da região inguinal)	Ferida plantar	Ambos
VRS11a; VRSA-11a; DE-11a	USA100, CC5	Delaware, 2010	> 256 (VD, MS)	<i>E. faecalis</i> (mesma amostra)	Exsudado purulento de infecção de prótese articular	Ambos
VRS11b; VRSA-11b; DE-11b*	USA100, CC5	Delaware, 2010	> 256 (CR, MS)	<i>E. faecalis</i> (mesma amostra)	Exsudado purulento de infecção de prótese articular	Ambos
DE-12	Não-tipável por PFGE, CC5	Delaware, 2010	ND	<i>E. gallinarum</i> (cultura rectal)	Exsudado vaginal	Apenas VRE
DE-13	USA1100, CC30	Delaware, 2012	256	<i>E. faecalis</i> (cultura rectal)	Ferida plantar	Ambos
VRSA 14	USA100, CC5	Delaware, 2015	512	<i>E. faecalis</i> (mesma amostra)	Ferida crônica de dedo do pé	ND
Não nomeada	ST1283	Mashhad, 2012	512	Não isolado	Aspirado brônquico	ND
Não nomeada	ND	Teerão, 2012	512	ND	Exsudado purulento (abcesso)	ND
STM2	ND	Calcutá, 2008	64	ND	ND	ND
CP2	ND	Karachi, 2008	16	ND	Hemocultura	ND
BR-VRSA	USA300, ST8	São Paulo, 2012	> 256	<i>E. faecalis</i> (cultura rectal)	Hemocultura	Não
Não nomeada	CC5	São Paulo, 2012	256 (MS)	<i>E. faecalis</i> (cultura rectal)	Hemocultura	ND
Não nomeada	ST105**	Lisboa, 2013	1024	<i>E. faecalis</i> (mesma amostra)	Ferida de amputação de dedo do pé	Ambos

Tabela 1 – Características moleculares de várias estirpes VRSA. CIM, Concentração inibitória mínima; CR, Constitutivamente resistente; MS, Meticilina-sensível; NA, Não aplicável; ND, Não disponível; PFGE, Electroforese em gel de campo pulsado; SD, Sentido directo; SI, Sentido inverso; VD, Vancomicina-dependente; VRE, *Enterococcus* resistente à vancomicina; VRSA, *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina. *Co-isolado com VRS11a, constitutivamente resistente à vancomicina.

**Variante de *locus* único de CC5. Continua na página seguinte.

NOMES	pSK41-TIPO ENCONTRADO	PLASMÍDEO <i>vanA</i> -POSITIVO EM VRSA	TIPO DE TN1546	REFERÊNCIAS
VRS1; VRSA-1; MI-1; MI-VRSA	Sim (VRSA e MRSA relacionado)	Plasmídeo estafilocócico pSK41-tipo (pLW1043, 57,9 kb)	Prototípico	35,60,69-72
VRS2; HMC3; VRSA-2; PA-2; PA-VRSA	Sim (VRSA)	Plasmídeo enterocócico quimérico (120 kb)	Derivado de prototípico (deleção de 3098n em 5', eliminando <i>orf1</i> ; IS1216V SD em 5'; IS1251 SI entre <i>vanS</i> e <i>vanH</i>)	31,60,71-75
VRS3a; VRSA-3a; VRSA 595; NY-3	Sim (MRSA relacionado)	Plasmídeo enterocócico (pLW595, 100 kb)	Derivado de prototípico (deleção de 3343n em 5', eliminando <i>orf1</i> e parte de <i>orf2</i> ; IS1216V SI em 5'; IS1251 SI entre <i>vanS</i> e <i>vanH</i>)	38,60,72,75
VRS3b; VRSA-3b; VRSA 5734	ND	ND	ND	38,76
VRS4; VRSA-4; MI-4	Não	Plasmídeo enterocócico Inc18-tipo	Prototípico	13,60,72,75
VRS5; VRSA-5; MI-5	Não	Plasmídeo enterocócico Inc18-tipo	Prototípico	13,60,72,75
VRS6; VRSA-6; MI-6	Não	Plasmídeo estafilocócico	Prototípico	13,60,72,75
VRS7; VRSA-7; MI-7	Não	Plasmídeo enterocócico Inc18-tipo	Prototípico	13,40,42,60,72,75
VRS8; VRSA-8; MI-8	Sim (VRSA e MRSA relacionado)	Plasmídeo estafilocócico quimérico, pSK41-tipo	Prototípico	59,60,75,77
VRS9; VRSA-9; MI-9	Sim (VRSA)	Plasmídeo estafilocócico pSK41-tipo	Prototípico	43,59,60,75,77
VRS10; VRSA-10; MI-10	Não	Plasmídeo enterocócico	Prototípico	44,60,75,78
VRS11a; VRSA-11a; DE-11a	Sim (VRSA)	Plasmídeo quimérico (junção de dois plasmídeos, um enterocócico e um estafilocócico)	Derivado de prototípico (ISEfl entre <i>vanX</i> e <i>vanY</i>)	44,60,75
VRS11b; VRSA-11b; DE-11b*	Sim (VRSA)	Plasmídeo quimérico (junção de dois plasmídeos, um enterocócico e um estafilocócico)	Derivado de prototípico (ISEfl entre <i>vanX</i> e <i>vanY</i>)	60,75
DE-12	Não	ND	ND	60
DE-13	Sim (MRSA não relacionado)	ND	ND	60
VRSA 14	ND	ND	ND	61
Não nomeada	ND	Plasmídeo > 10 kb	Gene <i>vanA</i> prototípico	66
Não nomeada	ND	ND	Gene <i>vanA</i> prototípico; <i>vanR</i> e <i>vanS</i> com a dimensão esperada; prováveis sequências de inserção	67
STM2	ND	Plasmídeo 53,4 kb	Prototípico	65
CP2	ND	ND	Derivado de prototípico (sequência truncada, deleção de <i>orf1</i> , sequência de inserção)	68
BR-VRSA	Não	pBRZ01 (55,7 kb)	Derivado de prototípico (deleção de 3397n em 5', eliminando <i>orf1</i> e parte de <i>orf2</i> ; IS1216 em 5'; deleção de 96 bp a jusante de <i>vanZ</i> , com inserção de genes de resolvase e transposase enterocócicos Tn3)	63,64
Não nomeada	ND	Plasmídeo 55,7 kb (semelhante a pBRZ01)	ND	63,64
Não nomeada	Não	Plasmídeo enterocócico Inc18-tipo	Derivado de prototípico (ISEfl entre <i>vanX</i> e <i>vanY</i>)	62,79,80

CASO	LOCALIZAÇÃO	ANO, MÊS	IDADE, SEXO	LOCAL ANATÓMICO	VANCOMICINA PRÉVIA	ANTECEDENTES RELEVANTES	TRATAMENTO	EVOLUÇÃO	REFERÊNCIAS
VRS1	Michigan	2002, Junho	40, F	Ponta de catéter, úlcera plantar	6 ½ semanas	DM, UCMI, DVP, DRCH, HTA	Remoção do catéter; Metronidazol, co-trimoxazol, tratamento agressivo da ferida e desbridamento cirúrgico.	Culturas negativas, recuperação clínica.	12,35,73,83
VRS2	Pensilvânia	2002, Setembro	70, M	Úlcera calcaneana	Não nos 5 anos prévios (alergia)	Obesidade mórbida, UCMI, osteomielite, estado após amputação	Linezolida, co-trimoxazol e piperacilina/tazobactam, lavagens diárias com clorhexidina e tratamento da ferida.	Culturas negativas. A úlcera estava a cicatrizar, mas o doente acabou por falecer	13,31,58,74
VRS3a VRS3b	Nova Iorque	2004, Março	63, F	Urina e tubo de nefrostomia	Não nos 5 meses prévios	EM (estádio avançado), DM, ITUs recorrentes, litíase renal, gastrostomia	Levofloxacina (10 dias).	Culturas positivas. A doente faleceu em internamento.	13,32,38
VRS4	Michigan	2005, Março	78, M	Ferida com gangrena num dedo do pé	9 semanas	DM2, DAC, DVP, DRC, neuropatia, uropatia obstrutiva, estado após SVA	Amputação do dedo em gangrena, combinação de linezolida e rifampicina e tratamento da ferida.	Culturas negativas, recuperação clínica.	13,84
VRS5	Michigan	2005, Outubro	58, F	Ferida cirúrgica abdominal, colonização inguinal	9 semanas	Obesidade mórbida, HTA, asma, bronquite crónica, artrite	Desbridamento e terapêutica de vácuo da ferida, lavagem inguinal com clorhexidina.	Culturas negativas, regeneração da ferida.	13
VRS6	Michigan	2005, Dezembro	48, M	Úlceras plantares, colonização nasal	Cerca de 10 anos (controlo de ocorrências infecciosas)	Cirurgia de alongamento do membro inferior após fracturas traumáticas (1995) complicada por osteomielite, UCMI	Daptomicina e desbridamento da ferida, mupirocina nasal.	Culturas negativas.	13
VRS7	Michigan	2006, Outubro	43, F	Ferida de fasciite necrotizante	5 semanas	DM, DRCH, UCMI, diarreia crónica	Linezolida e ertapenem e tratamento da ferida.	Culturas negativas, cicatrização da ferida.	13
VRS8	Michigan	2007, Outubro	48, F	Ferida plantar	7 meses	DM, UCMI, co-infecções por MRSA e VRE	Linezolida e meropenem (15 dias).	Regressão da infecção.	59
VRS9	Michigan	2007, Dezembro	54, F	Ferida plantar	4 semanas	DM	Daptomicina (6 semanas)	Regressão da infecção.	59
VRS10	Michigan	2009	53, F	Ferida plantar	ND	ND	ND	ND	60,78
VRS11a VRS11b	Delaware	2010	63, F	Exsudado purulento de infecção de prótese articular	3 meses	ND	ND	ND	60,85,86
DE-12	Delaware	2010	ND, F	Exsudado vaginal	ND	ND	ND	ND	60
DE-13	Delaware	2012, Março	70, M	Ferida plantar	6 semanas (interrompida 2 semanas antes)	HTA, DM	ND	ND	60
VRSA 14	Delaware	2015, Fevereiro	ND, ND	Ferida plantar	Não nos 4 meses prévios	DM, DRCH	ND	ND	61

Tabela 2 – Características clínicas dos casos americanos de isolamento de VRSA.

CIM, concentração inibitória mínima; DAC, doença arterial coronária; DM, diabetes *mellitus*; DRC, doença renal crónica; DRCH, doença renal crónica em hemodiálise; DVP, doença vascular periférica; EM, esclerose múltipla; F, Feminino; EUA, Estados Unidos da América; HTA, hipertensão arterial; ITU, infecção do tracto urinário; M, Masculino; MDT, microdiluição em tubo; MNS, meios não-selectivos; ND, não disponível; PCR, *polymerase chain reaction*; SVA, substituição de válvula aórtica; UCMI, ulceração crónica dos membros inferiores; VRE, *Enterococcus* resistente à vancomicina

O 13º caso confirmado de infecção por VRSA nos EUA, e o terceiro reportado em Delaware, ocorreu em Março de 2012. Um homem de 70 anos de idade foi internado para tratamento de ferida plantar crónica e osteomielite. As culturas iniciais revelaram MRSA, contra o qual se iniciou antibioticoterapia com vancomicina. Antes de completar o tratamento o doente teve alta, mas a ferida continuou a drenar pus. Dois meses após a alta novas culturas revelaram VRSA. Esta estirpe destaca-se das outras por ser a única americana pertencente a uma linhagem associada a infecções na comunidade⁶⁰.

Os restantes casos confirmados pelo CDC encontram-se descritos na **Tabela 2**. Além dos 14 casos confirmados pelo CDC, foram reportadas pelo menos quatro outras estirpes VRSA nos EUA. Credito *et al*⁸¹ reportaram a utilização de 3 estirpes VRSA clinicamente isoladas no Centro Médico de Hershey num estudo. Os autores não esclarecem as circunstâncias destes isolamentos, nem caracterizam as estirpes. Tendo em conta que neste centro médico já tinha sido isolada uma estirpe em 2002⁵⁸, isto significa que foram isoladas pelo menos mais duas estirpes na Pensilvânia, embora não confirmadas pelo CDC.

Em 2012 foram reportados dois casos de endoftalmite causados por VRSA⁸². Embora não seja directamente divulgada, Nova Iorque é a localização mais provável. Ambos os casos ocorreram em homens idosos com múltiplas patologias, incluindo HTA, doença cardíaca e internamentos de repetição. Ambos os doentes tinham sido previamente submetidos a cirurgia à catarata e antibioterapia profiláctica sem vancomicina, mas desenvolveram endoftalmite no pós-operatório. O padrão de susceptibilidades foi determinado pelo sistema automático Vitek®2, mas não foi feita qualquer caracterização destas estirpes nem reportada confirmação por métodos de referência. Os doentes foram tratados com sucesso com combinação oral de linezolida e minociclina, seguida de uma combinação oral de minociclina e rifampicina. O segundo doente também recebeu combinação intra-vítrea de quinupristina/dalfopristina e amicacina.

ÁSIA

A larga maioria das estirpes VRSA foi descrita em países asiáticos, mas a relativa escassez na utilização de métodos confirmatórios e o número por vezes discrepantemente elevado de estirpes VRSA detectadas sugerem que várias destas estirpes são na verdade falsos positivos. Não obstante, o isolamento repetido de várias estirpes VRSA na Índia e no Irão levanta um possível interesse em posterior investigação nestas partes do Mundo, já que não é de excluir que, pela eventual existência de condições locais particulares, estas regiões do Mundo sejam de facto endémicas para estas estirpes, inclusivamente com mecanismos de resistência ou de transmissão de genes de resistência ainda não estudados. Nenhuma destas possibilidades foi explorada até à data.

IRÃO

As cinco primeiras estirpes VRSA reportadas fora dos EUA ocorreram em 2003 na cidade de Teerão⁸⁸, mas o estudo que as descreve não se encontra indexado na Web of Science. Apenas em 2007 seria reportada a

primeira estirpe iraniana – e asiática – *vanA*-positiva^{89,90} (TEH-2), cuja CIM era de 512 mg/L. Esta foi detectada num hospital em Teerão, em 2005, isolada de uma ferida cirúrgica num homem de 67 anos de idade, diabético, que faleceu durante o internamento^{89,90}. Havia uma história extensa de antibioticoterapia, incluindo vancomicina⁸⁹. Os autores também reportaram outra estirpe⁹⁰, mas as culturas estavam contaminadas por enterococos³⁶.

Em 2006 foram detectadas 3 outras estirpes, na cidade de Sari, Mazandaran⁹¹. A CIM mais alta reportada era de 32 mg/L e não foi pesquisado o gene *vanA*³⁶. Em 2011 foi isolada uma outra estirpe em condições semelhantes, na cidade de Khorramabad, Lorestan⁹².

Anvari *et al*⁹³ reportaram a ocorrência de três estirpes MR-VRSA em Rasht, Guilan, em 2011, isoladas em exsudados purulentos (dois dos doentes com terapêutica recente com glicopéptidos). As CIMs eram de 128-256 mg/L, tendo estas estirpes sido positivas por PCR para os genes *vanA* e *vanB* (não foi especificado o subtipo).

Em 2012 Azimian *et al*⁶⁶ caracterizaram uma estirpe isolada em Masshad, Rasavi Khorazan, num doente de 26 anos que tinha estado internado durante 3 meses para tratamento de complicações de doença de Crohn, tendo recebido terapêutica imunossupressora e antibióticos, mas não vancomicina. Três meses após o internamento, no contexto de um quadro de dificuldade respiratória, que viria a ser a causa de morte do doente, isolou-se MRSA num aspirado brônquico. Inicialmente, pelos resultados do TSA pelo método de Kirby-Bauer, foi iniciada antibioticoterapia com vancomicina, mas a análise para epidemiologia molecular revelou que se tratava de uma estirpe VRSA *vanA*-positiva (**Tabela 1**). Nunca se isolou *Enterococcus faecalis* neste doente.

No mesmo ano, na cidade de Teerão, uma outra estirpe *vanA*-positiva foi reportada por Dezfulian *et al*⁶⁷ (**Tabela 1**). Esta foi detectada num abscesso (infecção adquirida na comunidade) numa doente de 51 anos com história de DM.

Uma outra estirpe foi reportada em 2013 por Moravvej *et al*⁹⁴, isolada da mucosa nasal de uma enfermeira de 33 anos em Shiraz, Fars. O fenótipo foi confirmado por amplificação dos genes *van* (os autores não especificam quais genes).

Askari *et al*³⁶ reviram os casos de VRSA no Irão, incluindo artigos publicados e resumos de apresentações em congressos. Neste estudo reportam-se mais 9 estirpes, isoladas entre 2007 e 2011, cuja CIM foi determinada por métodos válidos, mas não houve acesso aos métodos detalhados relativos ao isolamento de cada uma destas estirpes. Uma destas foi positiva para o gene *vanA*, duas foram negativas, e as restantes não foram testadas.

ÍNDIA

Desde o isolamento da primeira estirpe VRSA no mundo¹² foram reportados vários casos na Índia. Os primeiros quatro, todos *vanA*-negativos, foram reportados em 2006 por Tiwari e Sen⁹⁵, e foram isolados

entre 2002 e 2005 em Vanarasi, Uttar Pradesh. Estas estirpes apresentavam CIMs de 16-64 mg/L; nos dois casos com CIM de 16 mg/L não havia história prévia de antibioticoterapia com vancomicina. Os outros dois, isolados em exsudados purulentos, tinham sido tratados com glicopéptidos durante mais de 20 dias, e acabaram por morrer.

O primeiro caso de uma estirpe MR-VRSA positiva para o gene *vanA* na Índia seria descrito em 2008 por Saha *et al*⁶⁵ (**Tabela 1**). O caso ocorreu num hospital em Calcutá, mas não existem dados clínicos disponíveis. Embora a CIM fosse de 64 mg/L, após indução verificou-se subida para 1024 mg/L. Esta, chamada STM2, foi a estirpe VRSA mais minuciosamente descrita a nível molecular na Índia.

Desde a publicação destes casos foram publicados vários outros, incluindo estirpes *vanA*-positivas cuja CIM foi determinada por um método validado, isoladas em Midnapore, Bengala Ocidental (8 estirpes cuja caracterização inicial⁹⁶ não se encontra indexada na Web of Science)⁹⁷; Chennai, Tamil Nadu (28 estirpes)⁹⁸; e no estado de Odisha (2 estirpes)⁹⁹. Quatro outras estirpes *vanA*-positivas foram reportadas por Goud *et al*¹⁰⁰ em 2011 na cidade de Bangalore, Karnataka, mas por limitações práticas a susceptibilidade à vancomicina foi determinada pelo método de Kirby-Bauer e não pela CIM¹⁰¹.

Outros casos reportados incluem 22 estirpes num estudo multicêntrico de 2016¹⁰² em que não foi reportado o método de determinação da CIM nem pesquisado o gene *vanA*, bem como três casos de abscessos após injeções intramusculares (com evolução favorável após tratamento) em que as estirpes reportadas não foram caracterizadas¹⁰³.

PAQUISTÃO

O primeiro caso de VRSA do Paquistão conhecido pela comunidade científica foi reportado em 2011 por Mirani e Jamil^{28,29,68}. Esta estirpe, *vanA*-positiva, chamada CP2 (**Tabela 1**), foi isolada numa hemocultura após cirurgia cardíaca antes de Fevereiro de 2008 em Karachi, Sínde, embora os autores não especifiquem a data exacta. Não houve acesso a mais detalhes sobre esta estirpe.

Três outras estirpes foram isoladas em 2009 na mesma cidade¹⁰⁴. A CIM, determinada por ϵ -test, era de 16-32 mg/L. A estirpe com CIM mais elevada foi isolada de um exsudado purulento de um homem com 63 anos de idade. Os autores não reportam a investigação do mecanismo de resistência destas estirpes; tendo em conta a sobrestimação da verdadeira CIM pelo ϵ -test^{23,33}, é provável que estas estirpes fossem na verdade VISA.

Em Lahore, Punjab, Liaqat *et al*¹⁰⁵ reportaram 5 estirpes VRSA. Os autores determinaram mas não reportaram a CIM, e não pesquisaram a presença do gene *vanA*.

EXTREMO ORIENTE

Em estudos sobre potenciais novos agentes terapêuticos contra MRSA e VRSA na Tailândia¹⁰⁶ e na Coreia do Sul¹⁰⁷ foi reportada a utilização de um total de seis estirpes VRSA que, no entanto, não foram caracteri-

zadas (com a exceção da CIM) nem os autores esclareceram as circunstâncias ou os métodos do seu isolamento.

Na China, na cidade de Cantão, Guangdong, foram encontradas estirpes VRSA, embora raras (os autores não especificam o número nem as caracterizam) a partir de 2011, coincidindo com a altura em que o método de Kirby-Bauer foi substituído pela determinação da CIM para todos os antimicrobianos testados¹⁰⁸.

ÁFRICA

Em Tlemcen, Argélia, Rebiahi *et al*¹⁰⁹ reportaram três estirpes VRSA (CIM de 16, 64 e 128 mg/L), isoladas em exsudados purulentos de doentes sem antibioticoterapia prévia. A CIM foi determinada após a estirpe ter sido rastreada como possível resistente pelo método de Kirby-Bauer, mas não se pesquisou o gene *vanA*.

Noutros países apenas existem estirpes reportadas da Etiópia¹¹⁰ e da Nigéria¹¹¹, mas nunca identificadas por métodos válidos.

BRASIL

Em 2012 foi registado um caso de um homem de 35 anos, com história conhecida de *mycosis fungoides*, toxicod dependência e DM, com infecções recorrentes da pele e tecidos moles, algumas tratadas empiricamente com vancomicina. As primeiras culturas positivas revelaram MR-VSSA. O doente foi tratado com vancomicina seguida de teicoplanina, mas a febre recorreu no dia após a suspensão da antibioticoterapia. As hemoculturas revelaram MR-VRSA *vanA*-positivo. O doente foi então isolado e tratado com daptomicina, tendo-se verificado diminuição da febre⁶³.

Nesta fase uma outra hemocultura foi positiva para 2 estirpes MSSA, uma delas MS-VSSA e a outra MS-VRSA. Com a exceção da presença do operão *vanA* na estirpe MS-VRSA, ambas as estirpes mostraram ser muito semelhantes. Esta estirpe MS-VRSA não era um derivado de MR-VRSA⁶⁴. Apesar dos esforços no tratamento da infecção, após a melhoria clínica inicial o doente acabou por falecer por complicações derivadas da doença de base⁶³. As duas estirpes VRSA referidas estão descritas na **Tabela 1**.

EUROPA

Melo-Cristino *et al*⁶² reportaram a primeira estirpe VRSA (**Tabela 1**) identificada na Europa, isolada num hospital de Lisboa, em Portugal. A doente tinha 74 anos de idade e antecedentes de DM, DRC em hemodiálise e DVP condicionando isquémia crítica dos membros inferiores (submetida a revascularização e amputação de dois dedos em gangrena). As culturas da ferida da amputação revelaram *Pseudomonas aeruginosa* e MR-VSSA, tendo a doente sido tratada com vancomicina e amicacina. Em Maio de 2013 isolou-se uma estirpe MR-VRSA *vanA*-positiva do pus da ferida da amputação. Da mesma amostra isolou-se ainda uma estirpe VR-*Enterococcus faecalis vanA*-positiva.

A doente foi tratada com daptomicina, rifampicina e amicacina, em conjunto com tratamento agressivo da ferida⁶². Ao fim de 3 semanas de tratamento as culturas foram negativas para VRSA, mas VRE apenas foi negativo às 5 semanas, após nova amputação ao nível do metatarso por evidência de osteomielite. A terapêutica foi modificada para piperacilina/tazobactam e colistina por persistência de *Pseudomonas aeruginosa*. Em Agosto a doente encontrava-se clinicamente estável e as culturas eram negativas, pelo que teve alta e a antibioticoterapia foi suspensa⁷⁹.

Na Europa apenas uma outra estirpe VRSA foi reportada. Na Alemanha, Huebner *et al*¹¹², conduzindo um inquérito relativo ao isolamento de organismos multirresistentes a nível nacional, em 2014, reportaram um caso de colonização por MR-VRSA. Não foi encontrada a caracterização desta estirpe.

Fenótipo VanA em *Staphylococcus aureus*

Durante algum tempo após o aparecimento das primeiras estirpes VRSA as noções sobre o mecanismo de resistência total à vancomicina em *Staphylococcus aureus* eram extrapoladas dos conhecimentos prévios sobre o fenótipo VanA dos enterococos. Apenas em 2004¹¹³⁻¹¹⁵ se havia de confirmar que o mecanismo de resistência é semelhante. Entre as estirpes VRSA encontradas no estudo actual positivas para genes *van*, com a excepção de três (e incerteza sobre mais uma⁹⁴) todas foram positivas apenas para o gene *vanA*. Estas três estirpes foram reportadas no Irão, apenas num estudo⁹³ em que se reportou a presença do gene *vanB* (os autores não especificam o subtipo), sempre em conjunto com o gene *vanA*. A presença do gene *vanB* em *Staphylococcus aureus* não foi reportada em qualquer outro estudo validado pelos métodos usados neste trabalho; embora exista a possibilidade de haver um mecanismo local para a emergência de estirpes tipo-VanB, o mais provável é tratar-se de casos falsamente positivos. Este fenótipo, se verdadeiro, não foi estudado em detalhe. Por esse motivo, neste trabalho apenas é descrito o fenótipo VanA. A revisão detalhada dos outros fenótipos Van está fora do âmbito desta revisão e poderá ser encontrada na **Referência 116**.

MECANISMO DE RESISTÊNCIA

Pouco após os primeiros casos reportados de resistência total à vancomicina em *Enterococcus*, em 1988^{117,118}, multiplicaram-se os casos reportados e notou-se a indutibilidade deste fenótipo e a sua capacidade de transferência entre espécies diferentes de *Enterococcus*^{119,120}. A proteína cuja produção era induzida pela vancomicina foi chamada VanA e o gene que a codifica, *vanA*, foi sequenciado¹²¹. Esta proteína tinha características de D-ala-D-ala ligase¹²², mas, consistentemente com as previsões^{123,124}, o seu produto é um precursor depsipeptídico, com terminal D-ala-D-lac¹²⁵, cuja afinidade de ligação à vancomicina é 1000 vezes inferior à do precursor pentapeptídico normal, com terminal D-ala-D-ala¹²².

O gene *vanA* está contido no transposão Tn1546, que é transportado pelo elemento conjugável tipo-Inc18 e tem uma dimensão de 10,8 kb⁶⁹. Este transposão contém nove genes: *vanA*, *vanS*, *vanR*, *vanH*, *vanX*, *orf1*,

orf2, *vanY* e *vanZ*¹²⁶. Os primeiros cinco são suficientes para a síntese de peptidoglicano na presença de vancomicina¹²⁷. A função da proteína VanZ é desconhecida¹⁷, mas as outras oito proteínas têm funções bem conhecidas na expressão do fenótipo VanA:

- **Hidrólise dos terminais D-ala-D-ala.** A dipeptidase VanX hidrolisa D-ala-D-ala, prevenindo a síntese dos precursores pentapeptídicos do peptidoglicano¹²⁸. A carboxipeptidase VanY completa a actividade de VanX ao hidrolisar os precursores pentapeptídicos normais¹²⁹.
- **Incorporação dos terminais D-lac.** A D-hidroxiácido desidrogenase VanH reduz o piruvato a D-lactato¹²², que é depois incorporado no peptidoglicano pela ligase VanA¹²⁵.
- **Regulação da expressão do operão.** A expressão de resistência à vancomicina é induzida pelos glicopéptidos¹²⁷ e inibida pela sua ausência¹³⁰. Na presença de glicopéptidos é induzida a fosforilação de VanS, que por sua vez fosforila (activa) VanR. A síntese das enzimas VanA, VanH, VanX e VanY é estimulada ao nível da transcrição por VanR na sua forma fosforilada¹²⁷. Na ausência de indução VanS estimula a desfosforilação de VanR, regulando negativamente a expressão dos genes de resistência¹³⁰. Contudo, a expressão da resistência mantém-se num nível basal baixo mesmo na ausência de pressão com vancomicina¹³¹.
- **Mobilização do elemento Tn1546,** mediada pela transposase ORF1 e pela resolvase ORF2¹²⁶.

PRECURSORES DE PEPTIDOGLICANO MODIFICADOS

Uma estirpe VRSA apresenta um conjunto de precursores do peptidoglicano distinto de outras estirpes, mas semelhante ao dos enterococos tipo-VanA. Na ausência de pressão com vancomicina existem vários componentes em comum, incluindo os precursores pentapeptídicos com terminal D-ala-D-ala, que compõem mais de 80% do total de material precursor. Contudo, mesmo nestas condições existe uma minoria de precursores depsipeptídicos, com terminal D-ala-D-lac, semelhantes aos descritos nos enterococos. Quando estas estirpes são pressionadas com vancomicina o conjunto de precursores muda drasticamente, verificando-se a substituição dos precursores pentapeptídicos pelos precursores depsipeptídicos e por um precursor tetrapeptídico com terminal D-lys-D-ala^{113,115}. A teicoplanina também tem actividade indutora, mas mais fraca que a vancomicina¹¹⁵.

ANTAGONISMO ENTRE RESISTÊNCIA À VANCOMICINA E METICILINA

Apesar de muitas estirpes VRSA serem também MRSA, o fenótipo VanA é independente da resistência à meticilina¹¹³. No entanto, a adição de oxacilina pode diminuir a CIM da vancomicina para a gama da susceptibilidade¹¹³. A PBP2 de *Staphylococcus aureus* é essencial para a expressão da resistência à vancomicina, uma vez que a PBP2a é incapaz de utilizar os precursores depsipeptídicos como substratos para a reacção de transpeptidação¹¹⁴, enquanto a PBP2 utiliza tanto os precursores depsipeptídicos como os penta-

peptídicos^{114,132}. Perante a inibição da PBP2 por um fármaco β -lactâmico em simultâneo com a substituição dos terminais pentapeptídicos pelos depsipeptídicos, induzida pela vancomicina, a PBP2a é então incapaz de construir uma camada de peptidoglicano funcional com os terminais depsipeptídicos disponíveis^{114,132}.

CUSTO BIOLÓGICO DA EXPRESSÃO DO OPERÃO *VanA*

A expressão basal do operão *vanA* não coloca uma desvantagem significativa em VRSA, mas confere-lhe uma vantagem importante na presença de vancomicina, apesar da diminuição do ritmo de crescimento nessas condições^{63,133}. Apesar de tudo, as estirpes MR-VSSA são capazes de se sobrepor às estirpes MR-VRSA num meio não-selectivo; a expressão basal do operão *vanA* pode justificar esta desvantagem ligeira. Parece portanto existir uma tendência para a eliminação gradual das estirpes VRSA mesmo na ausência de pressão com vancomicina¹³³.

ESTIRPES VRSA VANCOMICINA-DEPENDENTES

Por motivos desconhecidos, uma proporção significativa de estirpes VRSA revelou ser vancomicina-dependente. As estirpes VRS7^{17,42}, VRS9⁴³ e VRS11a⁴⁴ demonstraram uma dependência parcial *in vitro* de glicopéptidos para o seu crescimento, que era lento em placas sem vancomicina e normal nas placas de gelose de rastreio. Nestas estirpes predominam precursores depsipeptídicos do peptidoglicano mesmo na ausência de vancomicina, o que não se verifica em estirpes não-vancomicina-dependentes. Isto é resultado de uma mutação no gene *ddl* que diminuiu drasticamente a actividade da D-ala-D-ala ligase^{17,42,43}. O conteúdo do peptidoglicano é então determinado principalmente pela actividade da ligase VanA, que é induzida na presença de vancomicina, sendo portanto nessas condições que a síntese de peptidoglicano é máxima e o crescimento bacteriano é mais rápido. No caso de VRS11b, um derivado de VRS11a, o crescimento era indiferente na presença e na ausência de vancomicina no meio de cultura. Este derivado era uma variante constitutivamente resistente à vancomicina, provavelmente resultando de uma mutação no gene *vanR*. Neste caso, a D-ala-D-ala ligase disfuncional foi compensada pela ligase VanA constitutivamente activa, e portanto a vancomicina deixou de ser um nutriente importante para o crescimento desta estirpe⁴⁴.

A análise dos precursores citoplasmáticos do peptidoglicano da estirpe MS-VRSA brasileira na ausência de indução revelou uma proporção baixa de precursores depsipeptídicos⁶⁴, o que significa que muito provavelmente esta não seria uma estirpe MS-VRSA *mecA*-positiva, onde seria de esperar uma proporção muito superior destes precursores na ausência de indução^{17,42-44}.

Reforçando os achados de Severin *et al*¹¹⁴, estas estirpes vancomicina-dependentes, embora portadoras de um gene *mecA* íntegro e funcional, eram sensíveis aos β -lactâmicos^{17,42-44}. Esta sensibilidade deve-se ao funcionamento unilateral da ligase VanA, simulando uma situação de pressão com vancomicina: a PBP2a é incapaz de utilizar a maioria dos precursores e por isso a inibição da PBP2 é suficiente para inibir o crescimento destas estirpes. Desta forma, estas estirpes podem, conceptualmente, ser tratadas com um β -

lactâmico, apesar da produção de um gene *mecA* íntegro e funcional. Por outro lado, a ocorrência destas estirpes, com exigências nutricionais tão específicas, em números relativamente tão elevados sugere a possibilidade de existirem outras que não são detectadas pelos métodos convencionais usados por rotina no Laboratório de Microbiologia Clínica.

VARIABILIDADE DA EXPRESSÃO DE RESISTÊNCIA

Duas das estirpes americanas, VRS2 e VRS3a, as únicas LLR-VRSA americanas, diferem das outras na medida em que o seu grau de resistência à vancomicina é significativamente inferior em relação ao das outras estirpes^{32,58}. Este achado motivou vários estudos para explicar esta diferença, tendo sido levantadas várias hipóteses. A diferença na expressão do operão *vanA* foi a primeira³¹, mas verificou-se que não existem diferenças significativas a este nível entre as estirpes HLR-VRSA e LLR-VRSA¹¹⁵ e que, entre as duas estirpes LLR-VRSA, com níveis semelhantes de resistência à vancomicina, existia uma quantidade menor de terminais D-ala-D-lac em VRS3a¹³⁴.

Outra hipótese seria a existência de um elemento Tn1546 modificado nas estirpes LLR-VRSA^{31,38,72}, enquanto as estirpes HLR-VRSA do Michigan continham um elemento prototípico^{17,72}. Contudo, as estirpes HLR VRS11^{44,75}, a portuguesa^{79,80} e muito provavelmente também VRS3b³⁸ também eram portadoras de elementos Tn1546 modificados.

Mais tarde, Qureshi *et al*¹³⁵ verificaram que a deleção do sistema VraTSR, implicado na resposta à pressão na parede celular gerada pelos antibióticos que nela actuam, podia diminuir significativamente a resistência à vancomicina e a indução do operão *vanA*, bem como a resistência à oxacilina. Este grupo apenas estudou uma única estirpe, VRS1: embora seja possível que este sistema contribua para a variabilidade da expressão de resistência à vancomicina em estirpes clínicas, é incerto se isso de facto se verifica.

A explicação mais aceite actualmente é a instabilidade da expressão da resistência à vancomicina nas estirpes LLR-VRSA^{38,87,115,134}, tendo-se verificado a perda fácil da resistência após subcultura em meio não-selectivo, com perda do operão *vanA*, o que não ocorria nas estirpes HLR-VRSA. Périchon e Courvalin^{115,134} sugeriram que o fenótipo LLR se deve a uma taxa elevada de perda espontânea do operão *vanA* devida à provável presença de menos plasmídeos contendo o operão *vanA* nas estirpes LLR-VRSA, que são significativamente maiores que os das estirpes HLR-VRSA e portanto podem replicar-se com menor eficiência. Isto parece causar um atraso significativo na indução de resistência.

Este mecanismo pode explicar o isolamento de estirpes VISA *vanA*-positivas^{38,136,137}. A existência do gene *vanA* em estirpes que não o expressam totalmente sugere que a transferência de genes de resistência de *Enterococcus* spp. para *Staphylococcus aureus* pode ser mais frequente do que aparenta, e depois uma expressão reduzida destes genes leva a um fenótipo de resistência intermédia ou susceptibilidade que pode passar despercebido. O estudo detalhado do operão *vanA* destas estirpes (incluindo a sua localização), que nunca foi realizado, permitiria compreender o porquê desta expressão diminuída. Embora seja possível que

estas estirpes fossem verdadeiros VISA com um operão *vanA* inactivo (por exemplo, devido a mutações genéticas condicionando disfunção) ou falsos positivos, também é possível que estas estirpes fossem verdadeiras tipo-VanA, cuja CIM seria gerada pela replicação ineficaz do plasmídeo contendo o operão *vanA*, mais ainda que nas estirpes VRS2 e VRS3a, embora mantendo-se uma quantidade suficiente de células positivas para um resultado positivo por PCR³⁸.

O mecanismo causador do nível e estabilidade da resistência à vancomicina em VRS3b não foi esclarecido³⁸. Mesmo considerando-se que esta estirpe é muito semelhante a VRS3a⁷⁶, tendo em conta as conclusões de Périchon e Courvalin^{115,134} é pouco provável que sejam geneticamente iguais. É provável que tenha havido passagem do operão *vanA* para um plasmídeo de menores dimensões, com replicação mais eficiente. A comparação genética destas duas estirpes permitiria muito provavelmente compreender melhor as diferenças na expressão da resistência à vancomicina em estirpes HLR e LLR.

ESTIRPES VRSA NÃO-TIPO-VanA

Parece haver alguma sobreposição na CIM entre estirpes com fenótipo VISA e VRSA. Por um lado, em algumas estirpes VISA já foi observada a presença do operão *vanA*^{38,136,137}. Por outro lado, estirpes *vanA*-negativas já foram observadas com níveis de resistência classificáveis como resistência total^{52,95}. Já foi observada em laboratório a emergência de estirpes VRSA a partir de estirpes VSSA seleccionadas com vancomicina^{4,52,138,139}, tendo-se então verificado um aumento da espessura da parede celular nestas estirpes^{52,139}. As estirpes clínicas reportadas por Tiwari e Sen⁹⁵ não apresentavam CIM para a vancomicina superiores a 64 mg/L, em contraste com as CIM em geral muito superiores observadas em *Staphylococcus aureus* tipo-VanA, mas em condições de laboratório é possível elevar a CIM além destes valores⁵². Embora não seja de excluir um mecanismo diferente de resistência à vancomicina nestas estirpes clínicas, é provável que correspondam a um fenótipo VISA com uma CIM na gama da resistência total. Nesse sentido, é interessante notar que as estirpes VRSA reportadas por Tiwari e Sen⁹⁵ com CIM mais elevada tinham recebido antibioticoterapia prévia com vancomicina. Não foi realizada microscopia electrónica para documentar alterações na parede celular dessas estirpes. Uma outra possibilidade é a contaminação das amostras por *Enterococcus* spp., que pela possível geração de falsos positivos deve ser sempre excluída perante o isolamento de VRSA.

Transferência de Genes de Resistência de *Enterococcus* para *Staphylococcus aureus*

A relevância clínica dos achados de Noble *et al*¹¹ permaneceu incerta durante alguns anos. Colocou-se inclusivamente a possibilidade de a transferência do gene *vanA* não ocorrer na natureza³¹. Os receios, contudo, tornaram-se realidade quando a primeira estirpe VRSA tipo-VanA foi isolada, em 2002¹².

MECANISMOS DE INTEGRAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

O estudo genético de cada estirpe VRSA americana demonstrou que estas estirpes não eram relacionadas entre si e que o grau de semelhança era independente do local e data de isolamento, de onde se conclui que cada uma foi gerada por eventos genéticos independentes^{59,72,75,140}. Cada presumível *Enterococcus faecalis* dador identificado demonstrou um padrão de PFGE único, tendo-se excluído a hipótese de uma estirpe única dadora comum⁷². Consistentemente com um modelo de aquisição independente, as sequências Tn1546 demonstram segregação regional⁷⁵, de acordo com as variações regionais nos tipos de elementos Tn1546 presentes nas estirpes VRE tipo-Inc18 positivos⁷⁷. De facto, o estudo epidemiológico das estirpes VRSA americanas revelou que estas apresentam origens muito diferentes, cuja diferenciação terá começado antes do isolamento das primeiras estirpes MRSA^{60,75}.

A primeira estirpe VRSA foi isolada em simultâneo com uma estirpe VR-*Enterococcus faecalis*¹². O plasmídeo tipo-Inc18 portador do elemento Tn1546, presente na estirpe VRE, não era relacionado com o plasmídeo que continha o gene *vanA* na estirpe VRSA^{69,70}, mas o elemento Tn1546 presente na estirpe VRSA era idêntico ao elemento Tn1546 prototípico⁷¹ e a sequência do gene *vanA* era idêntica à do co-isolado VR-*Enterococcus faecalis*³⁵. Contudo, o plasmídeo existente na estirpe VRSA, tipo-pSK41, era muito semelhante ao plasmídeo existente numa estirpe MRSA isolada do mesmo doente, embora fosse significativamente maior^{69,70}. O mais provável é que o transposão Tn1546 tenha sido transferido por conjugação e depois incorporado num plasmídeo previamente existente na estirpe MRSA, tendo o plasmídeo enterocócico sido eliminado^{69,70}. Nos casos americanos 6, 8 e 9 parecem ter ocorrido sequências de eventos semelhantes^{72,75}.

Uma porção significativa do transposão Tn1546 estava presente na segunda estirpe VRSA³¹, embora não se encontrasse completa: o gene *orf1* e parte do gene *orf2* tinham sido eliminados^{31,71}. Além disso foram identificadas duas sequências de inserção⁷¹. No entanto, a localização do transposão era instável: derivados desta estirpe continham o gene *vanA* em posições diferentes, e não só a resistência à vancomicina podia aumentar para uma CIM de 2048 mg/L com indução mas também o gene *vanA* podia ser perdido após passagens em meios não-selectivos, com consequente perda do fenótipo de resistência^{73,87}. Este gene encontrava-se num plasmídeo quimérico de origem predominantemente enterocócica⁷⁵, de grandes dimensões (120 kb)³¹.

Um transposão Tn1546 modificado, de forma aproximadamente semelhante ao da segunda estirpe VRSA, foi encontrado em VRS3a. Neste caso, o plasmídeo, com cerca de 100 kb, foi transferido e mantido sem integração em qualquer cromossoma ou plasmídeo estafilocócico, pelo que apenas um evento genético foi necessário para a expressão de resistência. Um outro achado curioso neste caso é que a espécie dadora mais provável era *Enterococcus faecium* e não *Enterococcus faecalis*, embora seja possível que uma estirpe de *Enterococcus faecalis* que contivesse estes genes estivesse também presente, tivesse transferido um plasmídeo semelhante, e não tivesse sido detectada³⁸. Também no caso português e nos casos americanos 4,

5, 7 e 10, e provavelmente também o 13º, se verificou que o plasmídeo enterocócico se manteve no receptor estafilocócico, mas, com a exceção da estirpe portuguesa (a sequência de DE-13 não foi reportada), as sequências do transposão Tn1546 eram semelhantes à do elemento prototípico^{40,60,72,75,80}. A estirpe VRS3b foi isolada do mesmo doente e do mesmo local anatómico de VRS3a. Esta estirpe apresentava uma resistência mais estável e de nível mais elevado que VRS3a³⁸, mas de resto parece ser em tudo semelhante a VRS3a⁷⁶, embora não tenham sido esclarecidos os motivos destas diferenças.

As estirpes VRS11, isoladas no estado de Delaware, também apresentavam sequências Tn1546 diferentes do protótipo, contendo sequências de inserção^{44,75} de forma aproximadamente semelhante à da estirpe portuguesa⁸⁰. Nas estirpes VRS11 o plasmídeo que continha o operão *vanA* era um plasmídeo quimérico composto pela fusão de um plasmídeo estafilocócico com um plasmídeo enterocócico⁷⁵. As sequências Tn1546 e o perfil plasmídico das restantes estirpes encontradas no estado de Delaware não foram publicados.

Na estirpe MR-VRSA brasileira⁶³ também foi encontrado um transposão Tn1546 modificado, com algumas diferenças em relação às estirpes americanas, mas mantendo a deleção de *orf1* e parte de *orf2* e uma sequência de inserção. A jusante de *vanZ* existia uma deleção e uma sequência de inserção com genes de resolvase e transposase enterocócicos. Tendo em conta a semelhança entre o plasmídeo *vanA*-positivo desta estirpe e o da estirpe MS-VRSA co-isolada, é provável que o elemento Tn1546 da estirpe MS-VRSA⁶⁴ seja muito semelhante ao da estirpe MR-VRSA. A estirpe paquistanesa⁶⁸ também tinha um elemento Tn1546 modificado localizado num plasmídeo, mantendo algumas características em comum com as restantes estirpes, como a deleção de *orf1* e a presença de uma sequência de inserção. Não foi possível aceder à caracterização completa desta estirpe.

Entre as várias estirpes iranianas, por sua vez, em apenas duas^{66,67} se pesquisou a sequência do gene *vanA*, e em ambas esta era prototípica. Em apenas uma se descreveu o perfil plasmídico⁶⁶ mas não foi esclarecida a origem do plasmídeo portador do operão *vanA*. Na outra estirpe o elemento Tn1546 foi estudado pela amplificação dos genes individuais, e não pela sequência: os autores verificaram que a amplificação dos genes *vanR* e *vanS* originou produtos com o tamanho esperado, mas não conseguiram amplificar os genes *vanH* e *vanX*, o que se pode dever a disrupções destas regiões por sequências de inserção⁶⁷. Na estirpe indiana STM2, a única estirpe indiana descrita com este pormenor, também se encontrou um elemento Tn1546 prototípico, num plasmídeo cuja origem não foi esclarecida⁶⁵.

Em resumo, até à data foram sugeridas três vias possíveis para a emergência de estirpes VRSA⁴⁰:

- Integração do elemento Tn1546 num plasmídeo estafilocócico, com a perda do plasmídeo enterocócico original à medida que o plasmídeo quimérico se replica⁷⁰.
- Integração do elemento Tn1546 num plasmídeo quimérico contendo sequências estafilocócicas e enterocócicas de vários plasmídeos³¹.
- Replicação do plasmídeo enterocócico, contendo o operão *vanA*, no estafilococo recipiente³⁸.

PLASMÍDEOS ENTEROCÓCICOS TIPO-Inc18

Um facto que intrigou vários investigadores durante alguns anos foi a ocorrência preferencial das estirpes VRSA no estado do Michigan, nos EUA, demonstrando alguma limitação geográfica^{13,40}. Colocou-se a hipótese de isso se dever a características populacionais locais, mas não foram encontradas diferenças que justificassem a concentração das estirpes neste estado¹³.

Por razões desconhecidas, os plasmídeos enterocócicos mais frequentemente associados à transferência do operão *vanA* são os tipo-Inc18, mas outros, cuja natureza ainda não é clara, também se podem associar^{72,141}. Estes plasmídeos são transmissíveis entre células de *Enterococcus faecalis*, incluindo na natureza, entre estirpes diferentes⁷⁷, e facilitam a transferência dos genes de resistência à vancomicina de *Enterococcus* spp. para *Staphylococcus aureus*¹⁴².

Na maioria dos casos americanos (10/14) foi identificado um plasmídeo tipo-Inc18 em pelo menos uma estirpe VRSA ou VRE. No caso português tal plasmídeo foi encontrado em ambos⁸⁰. Estes resultados sugerem que estes plasmídeos são particularmente propensos à transferência de uma estirpe VRE para uma estirpe de *Staphylococcus aureus*^{72,77}. Zhu *et al*⁷⁷ verificaram que a prevalência dos plasmídeos tipo-Inc18 contendo o operão *vanA* em enterococos era significativamente superior no Michigan, mas não foi possível averiguar a existência de focos noutros estados. Nenhum outro grupo estudou esta diferença, mas outros grupos apresentaram resultados aproximadamente semelhantes aos de Zhu *et al* no estado do Michigan^{143,144}. Além disso, estes plasmídeos parecem ocorrer mais frequentemente em VR-*Enterococcus faecalis* e outras espécies relativamente a VR-*Enterococcus faecium*^{77,143,144}, tendo a prevalência máxima encontrada sido de 12,5% para *Enterococcus faecalis*, de 1,0% para *Enterococcus faecium* e de 13,0% para outras espécies⁷⁷. Desconhecem-se as razões destas diferenças, assim como se desconhece se a espécie portadora do plasmídeo é importante para a transferência do operão *vanA*.

Albrecht *et al*¹⁴⁴ detectaram ainda uma diminuição significativa da prevalência destes plasmídeos no Michigan a partir de 2010. Em 2011, Tosh *et al*¹⁴⁵, provavelmente em acordo com esses resultados, não detectaram qualquer estirpe VRE tipo-Inc18 positiva. Não são conhecidas as razões para esta diminuição, mas pode reflectir alterações devidas a flutuação natural ou intervenções com o objectivo de reduzir a colonização nosocomial por VRE¹⁴⁴. O facto é que, após ter sido reportada a oitava estirpe VRSA no estado do Michigan em 2009, nunca mais nenhuma outra estirpe VRSA foi reportada neste estado.

PLASMÍDEOS ESTAFILOCÓCICOS TIPO-pSK41

Zhu *et al*¹⁴² verificaram que a existência de um plasmídeo tipo-pSK41 em MRSA facilitava a recepção do plasmídeo tipo-Inc18 de VRE. No entanto, não é essencial que estes plasmídeos sejam transportados pela estirpe receptora: a sua presença extracelular facilita também a recepção dos plasmídeos tipo-Inc18 enterocócicos, embora com taxas de transferência mais baixas.

Foi encontrado um plasmídeo tipo-pSK41 em várias estirpes VRSA clínicas^{60,69,70,142}. Contudo, também em várias outras não se encontrou qualquer plasmídeo deste tipo^{60,142}: ou estas estirpes VRSA perderam os plasmídeos eventualmente ou nunca os possuíram. Nalguns destes casos foi encontrada uma estirpe MRSA tipo-pSK41 positiva, presumível precursora ou não⁶⁰, sugerindo possível mediação pela presença extracelular. Por outro lado, em seis casos não foram encontrados estes plasmídeos em qualquer bactéria isolada⁶⁰. O mesmo aconteceu com o português⁸⁰. É desconhecido, contudo, o papel que outras bactérias tipo-pSK41 positivas que não tenham sido encontradas possam ter desempenhado na transferência da resistência nesses casos¹⁴².

Estes plasmídeos parecem ser relativamente raros em *Staphylococcus aureus*, com prevalências aparentemente não superiores a 10%^{144,145,146}, e parecem ser mais comuns nas estirpes CC8¹⁴⁴, principalmente naquelas com padrões de resistência mais incomuns¹⁴⁶. Estes plasmídeos ocorrem em linhagens diferentes de *Staphylococcus aureus*, metilina-resistentes e metilina-sensíveis, o que significa que existe o potencial de emergência de VRSA em praticamente qualquer estirpe de *Staphylococcus aureus*^{144,145}. Ao contrário do que foi encontrado com os plasmídeos tipo-Inc18 enterocócicos, nos plasmídeos tipo-pSK41 estafilocócicos não foi encontrada variação significativa ao longo do tempo¹⁴⁴.

CO-COLONIZAÇÃO COM ORGANISMOS PRECURSORES DE VRSA

Vários grupos pesquisaram a co-colonização com MRSA e VRE para conhecer a prevalência ou para estudar factores de risco para tal co-colonização. A utilização de métodos semelhantes (que não ocorreu nestes estudos) é extremamente importante para a obtenção de resultados válidos e comparáveis. Idealmente, estes estudos devem ser conduzidos pela colheita de amostras de rastreio para colonização, que permite detectar doentes que nunca seriam detectados se apenas fossem usadas amostras clínicas¹⁴⁷. As taxas de co-colonização encontradas foram muito variáveis conforme os métodos utilizados, variando entre 2,7% e 62%, mas é unânime que uma proporção significativa da população se encontra co-colonizada^{143,147-152}.

Os factores de risco mais unanimemente encontrados para a co-colonização por VRE e MRSA incluem: idade mais avançada^{147,150}, sexo masculino^{147,152}, internamento em unidade de cuidados intensivos no internamento actual^{147,152}, antibioticoterapia recente^{143,147} e isolamento de *Enterococcus faecalis*¹⁴³. A co-colonização parece ser mais comum em amostras de pele e feridas^{143,152}.

Tendo em conta as circunstâncias óptimas para a emergência de VRSA, o potencial para tal emergência poderá ser melhor discernido se apenas forem procurados doentes co-colonizados por VR-*Enterococcus faecalis* tipo-Inc18 positivo e MRSA tipo-pSK41 positivo. No estudo de Reyes *et al*¹⁴³, todos os doentes com estirpes VRE tipo-Inc18 positivas sofriam de doenças crónicas, como DM, DRC em hemodiálise ou osteomielite. Relativamente a MRSA tipo-pSK41 positivo, os factores de risco encontrados para a colonização incluem a administração de qualquer antibioticoterapia, incluindo vancomicina¹⁴⁴, e a presença de feridas crónicas durante pelo menos 2 anos (não necessariamente a mesma ferida)¹⁴⁵. Nos dois estudos que

pesquisaram este tipo específico de co-colonização^{144,145}, nenhum encontrou um único doente co-colonizado, sugerindo que a co-colonização com organismos potencialmente precursores de VRSA é incomum, mesmo em indivíduos com maior risco de tal colonização.

RECEPÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Um achado interessante no estudo de VRSA é a aparente maior propensão das estirpes CC5 para receber genes de resistência à vancomicina de *Enterococcus* spp.⁷⁵, apesar de os plasmídeos tipo-pSK41 estarem presentes em várias outras linhagens^{144,145,146}. Pareceria provável que as estirpes CC5 possuísem alguma característica genética própria que as predispuesses a tal recepção.

A manipulação genética de *Staphylococcus aureus* é reconhecidamente difícil. A estirpe RN4220, capaz de receber plasmídeos de *Escherichia coli*, foi durante muito tempo a única passível de ser usada para esse fim, mas só em 2006 se começou a compreender os mecanismos subjacentes. Em 2006, Waldron e Lindsay¹⁵³ descreveram um sistema de restrição-modificação tipo I, até então desconhecido, a que chamaram SauI. Estirpes com defeitos neste sistema, como RN4220, revelaram uma maior propensão para recepção de material genético exógeno. Ao contrário de outros sistemas previamente descritos em *Staphylococcus aureus*, este tem localização cromossômica e parece ser partilhado por todas as estirpes. Os genes responsáveis pelo reconhecimento de sequências específicas (*hsdS*) são muito variáveis, tanto dentro da mesma estirpe como em linhagens diferentes, mas existem padrões de genes *hsdS* muito conservados dentro das mesmas linhagens de *Staphylococcus aureus*, que parecem ser responsáveis pela dificuldade na transmissão de material genético entre linhagens diferentes de *Staphylococcus aureus*. Isto parece resultar na elevada clonalidade desta espécie, e por isso os autores prevêm que é pouco provável que o operão *vanA* seja disseminado horizontalmente entre estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Waldron e Lindsay¹⁵³ notaram que estirpes com defeitos neste sistema apresentam maior capacidade de recepção de genes de resistência à vancomicina. Contudo, apesar de vários grupos terem conseguido transferir a resistência à vancomicina das estirpes VRSA clínicas para estirpes VSSA^{42,63,65,68-70,113}, a maioria das estirpes VRSA clínicas mantinha este sistema intacto^{75,154}.

Mais tarde, Corvaglia *et al*¹⁵⁵ descreveram um sistema de restrição-modificação tipo III, que codifica uma metilase responsável pela especificidade da sequência e uma endonuclease responsável pela clivagem do DNA não-metilado. Deficiências neste sistema (encontradas também em RN4220) foram associadas a um fenótipo semelhante ao descrito para SauI. Verificou-se que algumas estirpes CC5 japonesas também possuíam mutações neste sistema e que a sua propensão para receber material genético de *Escherichia coli* era semelhante à de RN4220, mas verificou-se que a maioria das estirpes VRSA clínicas também mantém este sistema intacto⁷⁵.

Embora possa parecer provável que o próprio formato do sistema SauI nas estirpes CC5 possa favorecer a recepção do elemento Tn1546, o motivo para a maior propensão para recepção deste elemento nas estirpes CC5 permanece por esclarecer.

EMERGÊNCIA DE VRSA NO MEIO AMBIENTE

Alguns grupos também estudaram a existência de estirpes VRSA no meio ambiente. Na região de Bengala Ocidental, Índia, Mandal *et al*¹⁵⁶ reportaram 15% de estirpes VRSA *vanA*-positivas em efluentes hospitalares, enquanto Bhattacharyya *et al*¹⁵⁷ reportaram 2,55% de estirpes VRSA (todas *vanA*-negativas) em amostras de leite pela medição da CIM (não houve acesso aos métodos). Na Turquia, Içgen¹⁵⁸ reportou a existência de VRSA no rio Kızılırmak, nas proximidades da cidade de Kırıkkale. Duas estirpes foram reportadas como MR-VRSA, com CIM para a vancomicina de 128 mg/L, ambas positivas para o gene *vanA*. Também foram encontradas estirpes VR-*Enterococcus faecalis*, cujo gene *vanA* demonstrava uma semelhança elevada em relação ao das estirpes VRSA. Este achado sugere fortemente a possibilidade da emergência de VRSA no ambiente, mas é importante referir que Sung e Lindsay¹⁵⁴ demonstraram que a maioria das estirpes que mais facilmente recebem elementos de resistência à vancomicina ocorre em animais e não em humanos, pelo que a importância epidemiológica destes achados é questionável. Apesar de tudo, também não é de excluir que nestes locais existam estirpes que possam ocorrer em humanos e existam condições favoráveis à transferência da resistência, mas tal possibilidade nunca foi esclarecida.

Tratamento da Infecção por VRSA

Uma vez que as estirpes MR-VRSA são essencialmente estirpes MRSA que adquiriram um operão que confere resistência aos glicopéptidos, será de esperar que os fármacos não-glicopeptídicos activos contra MRSA sejam também activos contra VRSA. As estirpes MS-VRSA podem ser tratadas adequadamente com uma isoxazolilpenicilina.

Casos de infecção por VRSA são ainda muito raros, portanto a experiência clínica actual apenas dificilmente fornece orientações precisas para o tratamento adequado destas estirpes. Contudo, os dados até agora obtidos podem permitir guiar a terapêutica empírica até que sejam realizados outros testes de susceptibilidade¹⁴⁰.

A estratégia sugerida por Gould⁷ aceita a utilização de vancomicina ou co-trimoxazol num doente com factores de risco ou cultura positiva para MRSA quando a infecção não é grave, devendo-se atingir rapidamente concentrações terapêuticas. Perante uma infecção grave os glicopéptidos poderão ser uma alternativa inadequada; pode-se adicionar uma penicilina para cobrir MSSA, mas também poderá ser usada a daptomicina em monoterapia. Perante o isolamento de VRSA a daptomicina pode ser considerada primeira linha de tratamento, com co-trimoxazol, linezolida e ceftarolina como alternativas, mas a daptomicina não é apropriada como primeira linha contra estirpes VISA. Quando indicado, também se deverá recorrer à drenagem de abscessos e desbridamento de tecidos infectados.

LIPOPÉPTIDOS

A daptomicina é um agente não-nefrotóxico aproximadamente tão eficaz como as penicilinas contra estirpes MSSA. Mantém actividade contra a maioria das estirpes VRSA, pelo que constitui a primeira opção quando

se verifica uma má resposta terapêutica a um glicopéptido⁷. De facto, todas as estirpes testadas eram susceptíveis à daptomicina^{5,13,35,59,60,62,64,140,159,160}. É possível que a combinação com gentamicina produza um efeito sinérgico com benefício terapêutico⁸¹.

OXAZOLIDINONAS

A linezolida, um antimicrobiano bacteriostático, apresenta uma evidência cada vez maior da sua eficácia. A resistência é possível, mas permanece um achado raro⁷. De facto, no Mundo Ocidental todas as estirpes VRSA testadas eram susceptíveis à linezolida^{5,12,13,31,32,35,38,58,60,62,63,140,159}. Mesmo noutras regiões, quando a linezolida foi testada contra estas estirpes, em muitos casos foi reportada sensibilidade^{90,104,105}. Foram reportadas duas estirpes resistentes na Índia⁹⁹ e uma no Irão⁹⁴.

CEFALOSPORINAS ANTI-MRSA

As cefalosporinas anti-MRSA têm actividade contra a PBP2a pela sua acetilação irreversível¹⁶¹, gerando rapidamente uma alteração na sua conformação que permite o acesso ao local activo da enzima. Por esse motivo, estas cefalosporinas são actualmente os únicos β -lactâmicos activos contra as estirpes MRSA, e mantêm actividade bactericida contra MR-VRSA^{4,5,140,162-165}. A emergência de estirpes resistentes parece ser mais comum com o ceftobiprol que com a ceftarolina^{4,5,164}.

LIPOGLICOPÉPTIDOS

Os lipoglicopéptidos incluem a telavancina, a dalbavancina e a oritavancina. O uso da telavancina é limitado pela sua nefrotoxicidade⁷. Um mecanismo duplo de inibição da síntese de peptidoglicano e disrupção da integridade da membrana celular pode diminuir o desenvolvimento de resistências¹⁶⁶.

Apenas a telavancina e a oritavancina foram testadas contra VRSA. Ambas demonstraram actividade bactericida potente, apesar de uma possível diminuição resultante das modificações na parede celular¹⁶⁷⁻¹⁷⁰, mas mesmo assim comparável à actividade de outros fármacos eficazes contra MRSA¹⁶⁸⁻¹⁷¹. A combinação com gentamicina ou linezolida parece ser sinérgica e bactericida¹⁷². Os lipoglicopéptidos podem portanto ser uma boa opção no tratamento de infecções por VRSA, mas ainda é necessária experiência clínica que confirme esta possibilidade.

TETRACICLINAS E GLICILCICLINAS

As tetraciclinas, um grupo de antimicrobianos bacteriostáticos que inclui a minociclina e a tetraciclina, também revelaram ser activas contra várias estirpes⁷. Todas as estirpes ocidentais testadas eram susceptíveis à minociclina^{12,31,32,35,58,63,140}. A tetraciclina também revelou ser activa contra pelo menos cinco estirpes ocidentais^{12,35,59,62,63}, mas foi reportada resistência em dois casos^{31,38,87}, não tendo sido testada a susceptibilidade ou resistência de outras estirpes. A tetraciclina também revelou ser eficaz contra algumas estirpes

asiáticas^{90,95}, mas também foram reportadas algumas resistentes^{66,104}. Fora dos EUA apenas foi reportada uma estirpe sensível à minociclina⁶⁶, mas não foi reportada nenhuma estirpe resistente.

A tigeciclina, uma glicilciclina, é um fármaco bacteriostático geralmente reservado como última linha no tratamento de infecções por organismos multirresistentes, e mantém actividade contra muitas estirpes VRSA⁷. Todas as estirpes ocidentais testadas eram susceptíveis^{59,60,62,87,165}, mas numa também se reportou resistência¹⁴⁰. Duas estirpes indianas foram reportadas como resistentes⁹⁹.

QUINUPRISTINA/DALFOPRISTINA

A quinupristina/dalfopristina é uma combinação bactericida, mas menos usada por questões de toxicidade⁷. Apresenta um mecanismo de acção duplo, que diminui a taxa de resistências¹⁷³. Esta combinação revelou ser activa contra todas as estirpes VRSA ocidentais testadas^{5,12,13,31,32,35,58,59,62,159,160}. Foi reportada uma estirpe resistente no Irão⁹⁴.

OUTROS FÁRMACOS

Outros antimicrobianos mais antigos com actividade contra MSSA e MRSA, como o co-trimoxazol, o cloranfenicol e o ácido fusídico, também são muito frequentemente activos contra estirpes VRSA. Estes fármacos são bacteriostáticos⁷. De facto, o co-trimoxazol revelou ser activo contra a maioria das estirpes VRSA ocidentais^{5,12,31,32,35,58,60,62,87,140}, mas algumas foram reportadas como resistentes^{5,59,63}. Na Ásia algumas estirpes foram reportadas como susceptíveis^{66,95}, mas também foram reportadas estirpes resistentes^{65,67}.

O cloranfenicol, cujo uso é limitado pela sua toxicidade, também revelou ser activo contra todas as estirpes VRSA ocidentais testadas^{12,31,32,35,38,58-60,62,63}. Na Ásia foi reportada uma estirpe resistente⁶⁵.

A rifampicina, bactericida, também é muito frequentemente activa. De facto, entre todas as estirpes VRSA ocidentais, apenas VRS1¹³ foi reportada como resistente à rifampicina; todas as outras testadas foram reportadas como sensíveis^{31,32,38,58-60,62,63,87,140}. Na Ásia algumas estirpes foram reportadas como resistentes^{65,66}.

A susceptibilidade reportada às quinolonas tem sido muito variável. Todas as estirpes VRSA ocidentais revelaram ser resistentes às quinolonas testadas^{38,60,62,63,140}. Na Ásia também foram reportadas estirpes resistentes^{66,95,104,105}, mas também foram reportadas algumas estirpes sensíveis^{65,94,105}.

TERAPÊUTICAS EM ESTUDO

Desde o aparecimento das primeiras estirpes VRSA que vários grupos tentaram criar novas alternativas à vancomicina para o seu tratamento. Neste contexto surgiram vários novos fármacos e novas utilizações de fármacos antigos que não alcançaram, pelo menos por enquanto, a prática clínica.

O antagonismo entre a resistência aos β -lactâmicos e a resistência à vancomicina^{113,134} gerou a hipótese de que tal combinação poderia ser usada na prática contra VRSA. Um estudo conduzido num modelo animal

de endocardite¹⁷⁴ sugeriu que estas combinações poderão ser eficazes na clínica, mas não comparou a sua eficácia com a de outros fármacos eficazes. Contudo, é possível que estas combinações sejam insuficientes para a terapêutica eficaz^{113,174}.

Mais recentemente, trabalhando-se nestes achados, foi desenvolvido um fármaco heterodimérico composto por um núcleo de glicopéptido e um anel de cefalosporina, chamado TD-1792. Este fármaco encontra-se actualmente em ensaios clínicos, mas aparenta ser mais eficaz que os fármacos actualmente considerados primeira linha contra VRSA¹⁷⁵. Rebiahi *et al*¹⁰⁹ também notaram uma interacção sinérgica entre a vancomicina e a gentamicina contra VRSA.

Mais recentemente alguns grupos começaram a explorar novos glicopéptidos como armas terapêuticas contra VRSA. Os fármacos estudados incluem uma formulação nanoconjugada da vancomicina⁹⁷ e uma formulação de vancomicina ligada a nanopartículas de ouro¹⁷⁶, mas nestes estudos foram usadas estirpes não validadas pelos métodos usados no estudo actual. Um outro glicopéptido, Van-M-02, com um mecanismo de acção duplo que parece abranger a síntese dos intermediários lipídicos, parece ser activo contra VRSA. A sua actividade é diminuída pela presença de terminais D-ala-D-lac, mas não tanto como a da vancomicina, o que sugere um mecanismo de acção mais independente do substrato neste novo fármaco¹⁷⁷.

Também foram testadas novas formulações de quinolonas contra estas estirpes. Estas incluem uma nova formulação da nadifloxacina, a S-(–)-nadifloxacina¹⁷⁸ e vários derivados da norfloxacina¹⁷⁹. Em ambos os casos se reportou uma actividade bastante superior de pelo menos algumas destas quinolonas contra VRSA em relação às quinolonas convencionais.

Alguns péptidos antimicrobianos sintéticos também revelaram actividade significativa contra VRSA. Os péptidos LTX-109¹⁶⁰ e NZ2114¹⁸⁰, demonstraram actividade comparável à dos fármacos de primeira linha. A persulcatusina¹⁸¹ também revelou ser activa contra VRSA, mas a sua actividade não foi comparada com a de outros antimicrobianos usados clinicamente contra *Staphylococcus aureus*.

Mohammad *et al*^{182,183} reportaram a actividade bactericida de vários compostos tiazólicos contra várias estirpes de *Staphylococcus aureus*, incluindo VRSA. Foi observado sinergismo entre estes compostos e a vancomicina, tendo a CIM diminuído para a gama da susceptibilidade¹⁸³. A emergência de resistência, que já parece ser pouco provável, pode então ser ainda mais mitigada pela associação à vancomicina¹⁸³.

Davis *et al*¹⁸⁴ reportaram actividade antimicrobiana potente de vários compostos arilo-isonitrilo contra estirpes MRSA e VRS2 (único representante de VRSA neste estudo).

Alguns grupos reportaram a eficácia de diversos extractos de plantas contra VRSA^{107,111}, mas nestes estudos não foram usadas estirpes VRSA devidamente caracterizadas e com métodos de isolamento e identificação explícitos.

NOVOS ALVOS

Além dos estudos mencionados em que se pesquisa a actividade de fármacos já comercializados ou ainda em fase de ensaios mas com mecanismos de acção sobreponíveis aos já existentes, não está excluída a possibili-

dade de surgirem novas classes de antimicrobianos com acção sobre alvos ainda não abordados pelas opções actuais. Por exemplo, Hasan *et al*¹⁸⁵ analisaram o proteoma de VRSA e encontraram uma proteína ligada à membrana, sem homologia com qualquer proteína humana, que poderá vir a ser um alvo terapêutico no futuro. Por outro lado, a identificação de estirpes VRSA vancomicina-dependentes e a consequente verificação da importância da D-ala-D-ala ligase para o crescimento de *Staphylococcus aureus* levantou a possibilidade de atacar VRSA e outras bactérias pela actuação sobre esta enzima⁴³. A modulação farmacológica do sistema VraTSR também poderia, em teoria, ser utilizada contra VRSA¹³⁵, mas provavelmente exigiria a combinação com outros antimicrobianos.

Prevenção da Transmissão

As precauções usadas antes do conhecimento da infecção nos primeiros casos americanos eram as precauções universais de controlo da infecção. Após o isolamento de VRSA reforçaram-se essas precauções e iniciaram-se medidas acrescidas, como a colocação dos doentes em quartos individuais, ou, em doentes de ambulatório, tratamento dos doentes em áreas separadas dos outros doentes e durante a última marcação do dia. Atribuiu-se pessoal dedicado ao doente, com utilização de um novo conjunto de luvas e bata para cada interacção e máscaras com protecção ocular perante potencial de emissão de material infeccioso. Após a utilização dos equipamentos estes eram cuidadosamente limpos e desinfectados, tendo o mesmo sido feito aos quartos após a alta dos doentes. Estas precauções mantiveram-se durante o período de seguimento, que foi continuado durante pelo menos 3 semanas após uma cultura negativa sem antibioticoterapia ou se havia regeneração do local de infecção primária¹³.

Tendo em conta que MRSA é facilmente transmissível, é razoável assumir que as estirpes resistentes à vancomicina serão também facilmente transmissíveis²⁵. Quando uma estirpe VRSA é identificada, e antes ainda da sua confirmação, os profissionais envolvidos no cuidado do doente e a comissão de controlo de infecção devem ser imediatamente notificados para que as medidas de controlo de infecção pertinentes sejam aplicadas prontamente²². Mesmo perante a suspeita de uma infecção por *Staphylococcus aureus* não-susceptível à vancomicina é razoável iniciar precauções de contacto²⁵. O CDC elaborou normas detalhadas para a instituição de medidas de controlo de infecção por VRSA em vários contextos clínicos. Estas normas poderão ser encontradas na **Referência 22**.

A descolonização é uma alternativa que visa diminuir o reservatório de VRSA e que já foi usada com sucesso nalguns doentes^{13,22}. A decisão de iniciar terapêutica com este fim deve ser tomada em conjunto com o médico assistente e as autoridades de saúde pública. Em geral a mupirocina é o agente preferido para a erradicação da colonização nasal em surtos localizados de MRSA, mas o seu efeito é de curta duração e a recolonização é comum. Nalguns doentes também se pode recorrer a lavagens corporais com gluconato de clorohexidina. Um regime possível é a utilização de mupirocina duas vezes por dia em conjunto com lavagens corporais com clorohexidina durante 5-7 dias²².

Apesar de tudo até à data ainda não foram identificados casos de disseminação de estirpes VRSA^{12,13,35,59,61,62,74,79}. Aparentemente as precauções de contacto aplicadas são eficazes na prevenção da transmissão de VRSA⁷⁴.

Vigilância Epidemiológica

Em Portugal VRSA é considerado um microrganismo “alerta”, ou seja, que apresenta um padrão de resistência de baixa prevalência e que, por essa razão, o seu isolamento implica a implementação de medidas urgentes para a sua contenção. Estes microrganismos devem ser reportados, independentemente do tipo de amostra em que sejam isolados. Devem ser conservados e enviados, em cultura pura, ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, a fim de ser validado o padrão de resistência e, sempre que se justifique, estudado o respectivo mecanismo de resistência¹⁸.

Nos EUA, o CDC recomenda que todas as estirpes com CIM para a vancomicina de pelo menos 8 mg/L sejam enviadas ao CDC para confirmação da resistência. Caso seja confirmado o fenótipo VRSA, todas as estirpes VRE, MRSA e VRSA do doente devem ser guardadas para permitir a caracterização dos precursores²².

Tendo em conta a importância para a saúde pública, a detecção de VRSA deve desencadear uma investigação que inclui a investigação dos contactos, suspeite-se ou não de transmissão. Em contraste, perante o isolamento de VISA tal protocolo apenas é recomendado quando se suspeita de transmissão. O CDC elaborou um conjunto de normas detalhado para a investigação dos contactos²²:

- **Desenvolver um plano para os indivíduos colonizados ou infectados.** Deve saber-se previamente quais serão os procedimentos a aplicar a esses indivíduos.
- **Identificar e classificar os contactos.** Existem definições estabelecidas para a classificação em interacção extensa, moderada ou mínima. A identificação de contactos com interacção extensa é prioritária.
- **Colher as amostras.** As amostras devem ser obtidas de múltiplos locais, tendo em conta os locais de colonização mais comuns e locais clinicamente relevantes, sempre após obtenção de consentimento informado. Contactos com interacção moderada ou mínima podem não ser testados.
- **Avaliar a eficácia das precauções de controlo da infecção.** A identificação de VRSA deve iniciar um conjunto de medidas de precaução; a adesão a estas medidas, bem como às medidas gerais de controlo da infecção, deve ser avaliada.

Mais detalhes sobre estes procedimentos poderão ser encontrados na [Referência 22](#).

Perspectivas Futuras

Até à data as estirpes VRSA têm sido incomuns, mas vários factores suportam a possibilidade de haver muitos casos não notados ou reportados e a ocorrência de mais casos no futuro. A utilização, em vários

laboratórios, de métodos automáticos para testar a susceptibilidade aos antibióticos pode contribuir para um subdiagnóstico destas estirpes³⁸, e o mesmo poderá ocorrer com a utilização do método de Kirby-Bauer⁷. Por outro lado, são reportadas muitas estirpes por todo o Mundo que depois parecem ser recebidas com algum cepticismo, provavelmente pela escassez da caracterização de tais estirpes e da utilização de métodos confirmatórios. Apesar de tudo é possível que pelo menos algumas destas estirpes sejam verdadeiros VRSA, e esta possibilidade deve ser encarada com seriedade. Pode ainda haver várias estirpes isoladas que não são reportadas, como é o caso das estirpes obtidas em “isolamentos clínicos”, que apenas chegam ao conhecimento científico quando são utilizadas noutros estudos, sem qualquer caracterização (e portanto sem qualquer garantia de serem verdadeiros VRSA). A emergência destas estirpes na ausência de pressão selectiva^{32,66,74} e a manutenção do fenótipo após a cessação de tal pressão também são achados preocupantes.

O maior desafio no futuro pode nem ser o tratamento ou a contenção destas infecções, mas sim o diagnóstico preciso e atempado quando uma surgir⁸³. A indutibilidade da resistência pode dificultar muito a detecção destas estirpes, particularmente quando são estirpes LLR-VRSA, com maior probabilidade de falsos negativos¹³⁴. Também é possível a emergência de estirpes VRSA durante a colonização assintomática, mas é desconhecida a importância epidemiológica desta possibilidade.

Apesar de tudo, é possível olhar com optimismo para estas estirpes⁸³:

- São estirpes geralmente susceptíveis a vários antimicrobianos disponíveis, embora não seja de excluir o aparecimento de novas resistências no futuro^{40,83}.
- Embora seja muito provável que continuem a ocorrer casos de infecção por VRSA, pela necessidade de conjugação de condições muito improváveis (co-colonização por MRSA CC5 tipo-pSK41 positivo e VR-*Enterococcus faecalis* *vanA*-positivo e tipo-Inc18 positivo) o mais provável é que estas estirpes continuem a ser extremamente raras.
- As infecções por estas estirpes não parecem ser particularmente graves; apesar de parecerem ser tão virulentas como MRSA¹⁷⁴, estas estirpes foram notadas principalmente em doentes com várias morbididades e a mortalidade atribuível a estas infecções parece ser rara, tendo a maior parte dos casos regredido com a terapêutica adequada^{13,79,83}.
- Não se verificou até à data qualquer caso de transmissão de uma destas estirpes. Cada estirpe parece ser única e independente das outras^{72,75}. O facto de nunca ter sido detectada a transmissão de uma estirpe VRSA suporta a transmissibilidade limitada destas estirpes, e/ou que o fenótipo é suficientemente instável ou dispendioso para ser perdido mesmo após a transmissão.
- O aparecimento destas estirpes tem desencadeado a investigação de novos fármacos com actividade contra *Staphylococcus aureus*. Pela sua fraca actividade bactericida, fraca penetração nos tecidos e perfil de efeitos adversos, a perda dos glicopéptidos enquanto opção terapêutica não parece ser muito preocupante, e pode até ser algo de positivo ao fomentar o desenvolvimento de novas e melhores armas^{7,186}.

É muito provável que o controlo bem sucedido das estirpes MRSA acabe por dificultar a emergência de estirpes VRSA clinicamente relevantes. Com a utilização apropriada de antibióticos no meio hospitalar, eventualmente será possível que as bactérias susceptíveis, mais rápidas no seu crescimento, se sobreponham às bactérias resistentes, diminuindo a prevalência de MRSA e assim o potencial de emergência de VRSA^{186,187}. Em Portugal, em 2015, entrou em vigor uma nova norma da DGS visando o controlo da emergência de MRSA. Esta já foi implementada em vários serviços, mas os seus efeitos apenas serão mensuráveis no futuro⁶. Tendo em conta o contexto em que surgem as estirpes VRSA, é razoável pensar que o controlo da emergência de VR-*Enterococcus faecalis* também poderá ser uma medida eficaz na redução dos números de VRSA. Outras medidas importantes incluem a aplicação de boas práticas para prevenção de infecções nosocomiais e o tratamento correcto das doenças infecciosas. É muito importante a perseguição do diagnóstico microbiológico para minimizar a antibioticoterapia empírica prolongada^{25,62}.

É ainda incerto se estas estirpes prevalecerão ou não. Citando Fred Tenover⁴⁰, “Prever quais as estirpes resistentes que sobreviverão e se disseminarão é virtualmente impossível; prever que pelo menos algumas estirpes se disseminarão amplamente é uma certeza”. De qualquer forma, é muito provável que outros mecanismos de resistência à vancomicina venham a surgir e eventualmente a prevalecer.

Conclusão

VRSA permanece um organismo extremamente raro, mesmo ao fim de 15 anos após a descrição da primeira estirpe. A sua relevância clínica é entendida com alguma controvérsia, mas parece ser relativamente unânime que estas estirpes não têm constituído um problema clínico muito significativo, uma vez que (1) são muito raras, (2) estão associadas a infecções pouco graves, com mortalidade atribuível baixa, (3) o potencial de transferência horizontal da resistência é muito baixo, (4) existem geralmente várias opções disponíveis para o seu tratamento e (5) o potencial de transmissão interpessoal parece ser relativamente limitado. Contudo, na Ásia têm sido reportados números alarmantes destas estirpes, embora seja desconhecido se pelo menos alguns destes casos não serão falsos positivos. O diagnóstico correcto e atempado parece ser actualmente o maior desafio, mas não com a aplicação de métodos validados para tais fins, e é inclusivamente possível que venham a surgir métodos rápidos para tal diagnóstico. O grande problema é a prevalência muito elevada de estirpes MRSA, e será com o controlo destas que VRSA se tornará um problema cada vez menor, pela necessidade menos comum de recorrer à vancomicina. O controlo das estirpes VRE também será importante para diminuir o potencial de emergência de estirpes VRSA. Segundo o conhecimento actual sobre as estirpes VRSA parece muito provável que estas estirpes não se tornem problemáticas; a emergência e prevalência de outras formas de resistência à vancomicina, contudo, poderá ser uma possibilidade mais preocupante. Problemas actualmente maiores que VRSA incluem as estirpes VISA e hVISA, bem como o “deslizamento da CIM”, mas ainda é possível que surjam outros mecanismos com potencial para prevalecer.

Referências Bibliográficas

- Kirby WMM (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99(2579):452-453.
- Jevons MP (1961). "Celbenin"-resistant staphylococci. *British Medical Journal* 1(5219):124-125.
- Brown DJF e Reynolds PE (1980). Intrinsic resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters* 122(2):275-278.
- Bogdanovich T, Ednie LM, Shapiro S e Appelbaum PC (2005). Antistaphylococcal activity of ceftobiprole, a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(10):4210-4219.
- Saravolatz L, Pawlak J e Johnson L (2009). *In vitro* activity of ceftaroline against community-associated methicillin-resistant, vancomycin-intermediate, vancomycin-resistant, and daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(7):3027-3030.
- Fernandes PA, Silva MG, Cruz AP, Paiva JA, Nogueira PJ, Farinha CS et al (2015). Portugal – Prevenção e controlo de infeções e de resistência aos antimicrobianos em números – 2015. Direção-Geral da Saúde.
- Gould IM (2013). Treatment of bacteraemia: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents* 42S:S17-S21.
- Schaberg DS, Clewell DB e Glatzer L (1982). Conjugative transfer of R-plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 22(2):204-207.
- Clewell DB, An FY, White BA e Gawron-Burke C (1985). *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn918). *Journal of Bacteriology* 162(3):1212-1220.
- Showsh SA, De Boever EH e Clewell DB (2001). Vancomycin resistance plasmid in *Enterococcus faecalis* that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(7):2177-2178.
- Noble WC, Virani Z e Cree RGA (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 93(2):195-198.
- Sievert DM, Boulton ML, Stoltman G, Johnson D, Stobierski MG, Downes FP et al (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin --- United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* (Centers for Disease Control and Prevention) 51(26):565-567.
- Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ e Hageman JC (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clinical Infectious Diseases* 46(5):668-674.
- Tenover FC e Moellering Jr RC (2007). The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 44(9):1208-1215.
- Wikler MA, Cockerill FR, Craig WA, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hecht DW et al (2006). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement*. CLSI document M100-S16. Clinical Laboratory and Standards Institute 26(3).
- Patel JB, Cockerill III FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler JA, Jenkins SG et al (2015). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fifth informational supplement*. CLSI document M100-S25. Clinical Laboratory and Standards Institute 35(3).
- Périchon B e Courvalin P (2009). VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(11):4580-4587.
- Norma da Direção-Geral da Saúde 004/2013 (2015). *Vigilância epidemiológica das resistências aos antimicrobianos*. Direção-Geral da Saúde.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2017). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 7.0.
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S et al (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *The Lancet* 350(9092):1670-3.
- Tenover FC (2005). The real vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* has arrived. *Clinical Microbiology Newsletter* 27(5):35-40.
- Walters M, Lonsway D, Rasheed K, Albrecht V, McAllister S, Limbago B et al (2015). *Investigation and control of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus (VRSA): 2015 Update*. Centers for Disease Control and Prevention.
- Swenson JM, Anderson KF, Lonsway DR, Thompson A, McAllister SK, Limbago BM et al (2009). Accuracy of commercial and reference susceptibility testing methods for detecting vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 47(7):2013-2017.
- Holmes NE, Johnson PDR e Howden BP (2012). Relationship between vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-intermediate *S. aureus*, high vancomycin MIC, and outcome in serious *S. aureus* infections. *Journal of Clinical Microbiology* 50(8):2548-2552.
- Fridkin SK (2001). Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: What the infectious diseases specialist needs to know. *Clinical Infectious Diseases* 32(1):108-115.
- Chen HY, Chen CC, Fang SC, Hsieh YT, Lin MH, Lin MH et al (2011). Vancomycin activates σ B in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* resulting in the enhancement of cytotoxicity. *PLoS ONE* 6(9):e24472.
- Hsu CY, Lin MH, Chen CC, Chien SC, Cheng YH, Su IN et al (2011). Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 63(2):236-247.
- Mirani ZA e Jamil N (2011). Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Basic Microbiology* 51(2):191-195.
- Mirani ZA e Jamil N (2013). Role of extra-cellular fatty acids in vancomycin induced biofilm formation by vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 26(2):383-389.
- Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA (1998). Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *Journal of Clinical Microbiology* 36(4):1020-1027.
- Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S et al (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(1):275-280.
- Kacica M e McDonald LC (2004). Brief report: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* --- New York, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report* (Centers for Disease Control and Prevention) 53(15):322-323.
- Prakash V, Lewis II JS e Jorgensen JH (2008). Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(12):4528.
- Girard-Blanc C e Courvalin P (2005). Evaluation of non-automated techniques for phenotypic detection of VanA-type *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24(8):562-565.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP et al (2003). Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *The New England Journal of Medicine* 348(14):1342-1347.
- Askari E, Zarifian A, Pourmand MR e Naderi-Nasab M (2012). High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in Iran: A systematic review. *Journal of Medical Microbiology* 1(3,4):53-61.
- Raney PM, Williams PP, McGowan Jr JE e Tenover FC (2002). Validation of Vitek version 7.01 software for testing staphylococci against vancomycin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 43(2):135-140.
- Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, Jensen B, Clark NC, McDougal LK et al (2007). High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(1):231-238.
- Behera B e Mathur P (2009). Erroneous reporting of vancomycin susceptibility for *Staphylococcus* spp. by Vitek Software Version 2.01. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 62(4):298-299.
- Tenover FC (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: A perfect but geographically limited storm?. *Clinical Infectious Diseases* 46(5):675-677.
- Depardieu F, Périchon B e Courvalin P (2004). Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42(12):5857-5860.
- Moubareck C, Meziane-Cherif D, Courvalin P e Périchon B (2009). VanA-type *Staphylococcus aureus* strain VRSA-7 is partially dependent on vancomycin for growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(9):3657-3663.
- Meziane-Cherif D, Saul FA, Moubareck C, Weber P, Haouz A, Courvalin P et al (2010). Molecular basis of vancomycin dependence in VanA-type

- Staphylococcus aureus* VRSA-9. *Journal of Bacteriology* 192(20):5465-5471.
44. Périchon B e Courvalin P (2012). *Staphylococcus aureus* VRSA-11B is a constitutive vancomycin-resistant mutant of vancomycin-dependent VRSA-11A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(9):4693-4696.
 45. Sinsimer D, Leekha S, Park S, Marras SAE, Koren L, Willey B et al (2005). Use of a multiplex molecular beacon platform for rapid detection of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 43(9):4858-4591.
 46. Fosheim GE, Carey RB e Limbago BM (2007). Evaluation of the AdvanDX VRE EVIGENE assay for detection of *vanA* in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 45(5):1611-1613.
 47. Okolie CE, Wooldridge KG, Turner DPJ, Cockayne A e James R (2015). Development of a heptaplex PCR assay for identification of *Staphylococcus aureus* and CoNS with simultaneous detection of virulence and antibiotic resistance genes. *BMC Microbiology* 15:157.
 48. Coban AY, Bozdogan B, Cihan CC, Cetinkaya E, Bilgin K, Darka O et al (2006). Two new colorimetric methods for early detection of vancomycin and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 44(2):580-582.
 49. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM e MacGowan AP (2001). A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47(4):399-403.
 50. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP e Grayson ML (2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 23(1):99-139.
 51. Däum RS, Gupta S, Sabbagh R e Mielwski WM (1992). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: Isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *The Journal of Infectious Diseases* 166(5):1066-1072.
 52. Sieradzki K e Tomasz A (1996). A highly vancomycin-resistant laboratory mutant of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Laboratory Letters* 142(2-3):161-166.
 53. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T e Tenover FC (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40(1):135-136.
 54. Ploy MC, Grélaud C, Martin C, de Lumley L e Denis F (1998). First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *The Lancet* 351(9110):1212.
 55. Sieradzki K e Tomasz A (1997). Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 179(8):2557-2566.
 56. Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW e Tomasz A (1999). The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *The New England Journal of Medicine* 340(7):517-523.
 57. Gardete S, Aires-de-Sousa M, Faustino A, Ludovice AM e de Lencastre H (2008). Identification of the first vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) isolate from a hospital in Portugal. *Microbial Drug Resistance* 14(1):1-6.
 58. Miller D, Urdaneta V e Weltman A (2002). Public Health Dispatch: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* --- Pennsylvania, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* (Centers for Disease Control and Prevention) 51(40):902.
 59. Finks J, Wells E, Dyke TL, Husain N, Plizga Heddurshetti R et al (2009). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 15(6):943-945.
 60. Limbago BM, Kallen AJ, Zhu W, Eggers P, McDougal LK e Albrecht VS (2014). Report of the 13th vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 52(3):998-1002.
 61. Walters MS, Eggers P, Albrecht V, Travis T, Lonsway D, Hovan G et al (2015). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – Delaware, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 64(37):1056.
 62. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L e Ramirez M (2013). First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet* 382(9888):285.
 63. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S et al (2014). Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *The New England Journal of Medicine* 370(16):1524-1531.
 64. Panesso D, Planet PJ, Diaz L, Hugonnet JE, Tran TT, Narechania A et al (2015). Methicillin-susceptible, vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 21(10):1844-1848.
 65. Saha B, Singh AK, Ghosh A e Bal M (2008). Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *Journal of Medical Microbiology* 57(Pt1):72-79.
 66. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM et al (2012). Genetic characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran. *Journal of Clinical Microbiology* 50(11):3581-3585.
 67. Dezfulian A, Aslani MM, Oskoui M, Farrokh P, Azimirad M, Dabiri H et al (2012). Identification and characterization of a high vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring VanA gene cluster isolated from diabetic foot ulcer. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 15(2):803-806.
 68. Mirani ZA e Jamil N (2013). Genomic organization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 23(2):107-111.
 69. Flannagan SE, Chow JW, Donabedian SM, Brown WJ, Perri MB, Zervos MJ et al (2003). Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a *vanA* phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(12):3954-3959.
 70. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE et al (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 362(5650):1569-1571.
 71. Clark NC, Weigel LM, Patel JB e Tenover FC (2005). Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(1):470-472.
 72. Zhu W, Clark NC, McDougal LK, Hageman J, McDonald LC e Patel JB (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(2):452-457.
 73. Bozdogan B, Ednie L, Credito K, Kosowska K e Appelbaum PC (2004). Derivatives of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at Hershey Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(12):4762-4765.
 74. Whitener CJ, Park SY, Browne FA, Parent LJ, Julian K, Bozdogan B et al (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. *Clinical Infectious Diseases* 38(8):1049-1055.
 75. Kos VN, Desjardins CA, Griggs A, Cerqueira G, Van Tonder A, Holden MTG et al (2012). Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with methicillin-resistant *S. aureus* hospital-acquired infection in the United States. *mBio* 3(3):e00112-12.
 76. Product information sheet for NR-46413 (2014). American Type Culture Collection. BEI Resources. Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA).
 77. Zhu W, Murray PR, Huskins WC, Jernigan JA, McDonald LC, Clark NC et al (2010). Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-like *vanA* plasmid associated with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(10):4314-4320.
 78. Product information sheet for NR-46420 (2014). American Type Culture Collection. BEI Resources. Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA).
 79. Friães A, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M e Melo-Cristino J (2015). Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. *Epidemiology and Infection* 143(4):745-748.
 80. Ramirez M, comunicação pessoal.
 81. Credito K, Lin G e Appelbaum PC (2007). Activity of daptomycin alone and in combination with rifampin and gentamicin against *Staphylococcus aureus* assessed by time-kill methodology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(4):1504-1507.
 82. Stroh EM (2012). Quinupristin/dalfopristin in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* endophthalmitis. *Archives of Ophthalmology* 130(10):1323-1324.
 83. Bush K (2003). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the clinic: Not quite Armageddon. *Clinical Infectious Diseases* 38(8):1056-1057.
 84. Appelbaum (2006). The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 12(S1):16-23.
 85. Product information sheet for NR-46421 (2014). American Type Culture Collection. BEI Resources. Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA).

86. Product information sheet for NR-46422 (2014). American Type Culture Collection. BEI Resources. Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA).
87. Bozdogan B, Esel D, Whitener C, Browne FA e Appelbaum PC (2003). Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52(5):864-868.
88. Saderi H, Owlia P e Shahrbanooie R (2005). Vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Archives of Iranian Medicine* 8(2):100-103.
89. Emaneini M, Aligholi M, Hashemi FB, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H et al (2007). Isolation of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in a teaching hospital in Tehran. *Journal of Hospital Infection* 66(1):92-93.
90. Aligholi M, Emaneini M, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H e Sedaght H (2008). Emergence of high-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. *Medical Principles and Practice* 17(5):432-434.
91. Ghasemian R, Najafi N, Makhloogh A e Khademloo M (2010). Frequency of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial resistance pattern in patients on hemodialysis. *Iranian Journal of Kidney Diseases* 4(3):218-222.
92. Zadegan HH e Menati S (2011). The prevalence of methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in large teaching hospital personnel. *African Journal of Microbiology Research* 5(22):3716-3719.
93. Anvari M, Ranji N e Khoshmaslak F (2012). Antibacterial susceptibility of three vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated from northern part of Iran. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 6(2):671-675.
94. Moravvej Z, Estaji F, Askari E, Shljou K, Nasab MD e Saadat S (2013). Update on the global number of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) strains. *International Journal of Antimicrobial Agents* 42(4):367-378.
95. Tiwari HK e Sen MR (2006). Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infectious Diseases* 6:156.
96. Chakraborty SP, KarMahapatra S, Bal M e Roy S (2011). Isolation and identification of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* from post operative pus sample. *Al Ameen Journal of Medical Sciences* 4(2):152-168.
97. Chakraborty SP, Sahu SK, Pramanik P e Roy S (2012). *In vitro* antimicrobial activity of nanoconjugated vancomycin against drug resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Pharmaceutics* 436(1-2):659-676.
98. Budati S, Murty SN, Kuncham R, Vijayaraghavan R e Rao BN (2016). Studies on *vanA* gene loci among methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* in rural and urban tertiary care centers. *Journal of Environmental Biology* 37:625-630.
99. Kumar M (2016). Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, India, 2013-2015. *Emerging Infectious Diseases* 22(9):1666-1667.
100. Goud R, Gupta S, Neogi U, Agarwal D, Naidu K, Chalannavar R et al (2011). Community prevalence of methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in and around Bangalore, southern India. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(3):309-312.
101. Goud R, Gupta S, Neogi U, Agarwal D, Naidu K, Chalannavar R et al (2012). Authors reply: Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(2):279.
102. Mendem SK, Gangadhara TA, Shivannavar CT e Gaddad SM (2016). Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*: A multi center study from India. *Microbial Pathogenesis* 98:167-170.
103. Sambandam SN, Rohinikumar GJ, Gul A e Mounasamy V (2015). Intramuscular injection abscess due to VRSA: A new health care challenge. *The Archives of Bone and Joint Surgery* 4(3):277-281.
104. Taj Y, Abdullah FE e Kazmi SU (2010). Current pattern of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates and the emergence of vancomycin resistance. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 20(11):728-732.
105. Liaqat F, Sheikh AA, Nazir J, Hussain T, Rabbani M, Shaheen AY et al (2015). Isolation identification and control of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 28(3):997-1004.
106. Yingyongnarongkul B, Apiratikul N, Aroonrerk N e Suksamram A (2006). Solid-phase synthesis and antibacterial activity of hydroxycinnamic acid amides and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 16(22):5870-5873.
107. Cha JD, Lee JH, Choi KM, Choi SM e Park JH (2014). Synergistic effect between cryptotanshinone and antibiotics against clinic methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014:450572.
108. Xu Z, Xie J, Peters BM, Li B, Li L, Yu G et al (2017). Longitudinal surveillance on antibiogram of important Gram-positive pathogens in Southern China, 2001 to 2015. *Microbial Pathogenesis* 103:80-86.
109. Rebiahi SA, Abdelouahid DE, Rahmoun M, Abdelali S e Azzaoui H (2011). Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). *Médecine et Maladies Infectieuses* 41(12):646-651.
110. Shibabaw A, Abebe T e Mihret A (2014). Antimicrobial susceptibility pattern of nasal *Staphylococcus aureus* among Dessie Referral Hospital health care workers, Dessie, Northeast Ethiopia. *International Journal of Infectious Diseases* 25:22-25.
111. Akinpelu DA, Odewade JO, Aiyegoro OA, Ashafa AOT, Akinpelu OF e Agunbiade MO (2016). Biocidal effects of stem bark extract of *Chrysophyllum albidum* G. Don on *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16:105.
112. Huebner NO, Dittmann K, Henck V, Wegner C e Kramer A (2016). Epidemiology of multidrug resistant bacterial organisms and *Clostridium difficile* in German hospitals in 2014: Results from a nationwide one-day point prevalence of 329 German hospitals. *BMC Infectious Diseases* 16:467.
113. Severin A, Tabei K, Tenover F, Chung M, Clarke N e Tomasz A (2004). High level oxacillin and vancomycin resistance and altered cell wall composition in *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal *mecA* and the enterococcal *vanA* gene complex. *The Journal of Biological Chemistry* 279(5):3398-3407.
114. Severin A, Wu SW, Tabei K e Tomasz A (2004). Penicillin-binding protein 2 is essential for expression of high-level vancomycin resistance and cell wall synthesis in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the enterococcal *vanA* gene complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(12):4566-4573.
115. Périchon B e Courvalin P (2004). Heterologous expression of the enterococcal *vanA* operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(11):4281-4285.
116. Courvalin P (2006). Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42(S1):S25-S34.
117. Leclercq R, Derlot E, Duval J e Courvalin P (1988). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *The New England Journal of Medicine* 319(3):157-161.
118. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J e George RC (1988). Vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet* 1(8575-6):57-58.
119. Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J e Courvalin P (1989). Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33(1):10-15.
120. Uttley AHC, George RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH et al (1989). High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiology and Infection* 103(1):173-181.
121. Dutka-Malen S, Mohnas C, Arthur M e Courvalin P (1990). The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. *Molecular and General Genetics* 224(3):364-372.
122. Bugg TDH, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P e Walsh CT (1991). Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: Biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* 30(43):10408-10415.
123. Al-Obeid S, Collatz E e Gutmann L (1990). Mechanism of resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D366 and *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34(2):252-256.
124. Bugg TDH, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P e Walsh CT (1991). Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine:D-alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochemistry* 30(8):2017-2021.
125. Handwerger S, Pucci MJ, Volk KJ, Liu J e Lee MS (1992). The cytoplasmic peptidoglycan precursor of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* terminates in lactate. *Journal of Bacteriology* 174(18):5982-5984.
126. Arthur M, Molinas C, Depardieu F e Courvalin P (1993). Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology* 175(1):117-127.
127. Arthur M, Molinas C e Courvalin P (1992). The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology* 174(8):2582-2591.
128. Reynolds PE, Depardieu F, Dutka-Malen S, Arthur M e Courvalin P (1994). Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon

- Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Molecular Microbiology* 13(6):1065-1070.
129. Arthur M, Molinas C e Courvalin P (1992). Sequence of the *vanY* gene required for production of a vancomycin-inducible D,D-carboxypeptidase vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Gene* 120(1):111-114.
 130. Arthur M, Depardieu F, Gerbaud G, Galimand M, Leclercq R e Courvalin P (1997). The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *Journal of Bacteriology* 179(1):97-106.
 131. Arthur M, Depardieu F, Reynolds P e Courvalin P (1996). Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Molecular Microbiology* 21(1):33-44.
 132. Nakamura J, Yamashiro H, Miya H, Nishiguchi K, Maki H e Arimoto H (2013). *Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 2 can use deslipid II derived from vancomycin-resistant strains for cell wall synthesis. *Chemistry* 19(36):12104-12112.
 133. Foucault ML, Courvalin P e Grillot-Courvalin C (2009). Fitness cost of vanA-type vancomycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(6):2354-2359.
 134. Périchon B e Courvalin P (2006). Synergism between β -lactams and glycopeptides against VanA-type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and heterologous expression of the *vanA* operon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(11):3622-3630.
 135. Qureshi NK, Yin S e Boyle-Vavra S (2014). The role of the staphylococcal VraTSR regulatory system on vancomycin resistance and *vanA* operon expression in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE* 9(1):e85873.
 136. Banerjee T e Anupurba S (2012). Colonization with vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene in a tertiary-care center in North India. *Journal of Clinical Microbiology* 50(5):1730-1732.
 137. Muneeri SS, Mobaiyen H e Mirzaie H (2013). Study on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* and identification of *vanA* gene in these strains isolated from Tabriz Shuhada Hospital using E-test and PCR methods. *Life Science Journal* 10(1):748-752.
 138. Sass P, Berscheid A, Jansen A, Oedenkoven M, Szekat C, Strittmatter A et al (2012). Genome sequence of *Staphylococcus aureus* VC40, a vancomycin- and daptomycin-resistant strain, to study the genetics of development of resistance to currently applied last-resort antibiotics. *Journal of Bacteriology* 194(8):2107-2108.
 139. Ishii K, Tabuchi F, Matsuo M, Tatsuno K, Sato T, Okazaki M et al (2015). Phenotypic and genomic comparisons of highly vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains developed from multiple clinical MRSA strains by *in vitro* mutagenesis. *Scientific Reports* 5:17092.
 140. Saravolatz LD, Pawlak J e Johnson LB (2012). In vitro susceptibilities and molecular analysis of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Clinical Infectious Diseases* 55(4):582-6.
 141. De Niederhäusern S, Bondi M, Messi P, Isepri R, Sabia C, Manicardi G et al (2011). Vancomycin-resistance transferability from *vanA* enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology* 62(5):1363-1367.
 142. Zhu W, Clark N e Patel JB (2012). pSK41-like plasmid is necessary for Inc18-like *vanA* plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus* *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(1):212-219.
 143. Reyes K, Malik R, Moore C, Donabedian S, Perri M, Johnson L et al (2010). Evaluation of risk factors for coinfection of cocolonization with vancomycin-resistant *Enterococcus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 48(2):628-630.
 144. Albrecht VS, Zervos MJ, Kaye KS, Tosh PK, Arshad S, Hayakawa K et al (2014). Prevalence of and risk factors for vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* precursor organisms in Southeastern Michigan. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 35(12):1531-1534.
 145. Tosh PK, Agolory S, Strong BL, VerLee K, Finks J, Hayakawa K et al (2013). Prevalence and risk factors associated with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* precursor organism colonization among patients with chronic lower-extremity wounds in Southeastern Michigan. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 34(9):954-960.
 146. McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, Bulens SN, Limbago BM, Shearer JES et al (2010). Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(9):3804-3811.
 147. Furuno JP, Perencevich EN, Johnson JA, Wright MO, McGregor JC, Morris JG (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci co-colonization. *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1539-1544.
 148. Franchi D, Climo MW, Wong AHM, Edmond MB e Wenzel RP (1999). Seeking vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* among patients with vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Infectious Diseases* 29(6):1566-1568.
 149. Ray AJ, Pultz NJ, Bhalla A, Aron DC e Donskey CJ (2003). Coexistence of vancomycin-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* in the intestinal tracts of hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases* 37(7):875-881.
 150. Warren DK, Nitin A, Hill C, Fraser VJ e Kollef MH (2004). Occurrence of co-colonization or co-infection with vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 25(2):99-104.
 151. Wang Z, Cao B, Liu YM, Gu L e Wang C (2009). Investigation of the prevalence of patients co-colonized or infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci in China: A hospital-based study. *Chinese Medical Journal* 122(11):1283-1288.
 152. Hayakawa K, Marchaim D, Bathina P, Martin ET, Pogue JM, Sunkara B et al (2013). Independent risk factors for the co-colonization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the region most endemic for vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 32(6):815-820.
 153. Waldron DE e Lindsay JA (2006). Saul: A novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *Journal of Bacteriology* 188(15):5578-5585.
 154. Sung JML e Lindsay JA (2007). *Staphylococcus aureus* strains that are hypersusceptible to resistance gene transfer from enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(6):2189-2191.
 155. Corvaglia AR, François P, Hernandez D, Perron K, Linder P e Schrenzel J (2010). A type III-like restriction endonuclease functions as a major barrier to horizontal gene transfer in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(26):11954-11958.
 156. Mandal SM, Ghosh AK e Pati BR (2015). Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus* strains isolated from hospital effluents. *American Journal of Infection Control* 43(12):e87-e88.
 157. Bhattacharyya D, Jaydeep B, Samiran B, Bimalendu M, Pramod N, Indranil S (2016). First report on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in bovine and caprine milk. *Microbial Drug Resistance* 22(8):675-681.
 158. Içgen B (2016). VanA-type MRSA (VRSA) emerged in surface waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 97(3):359-366.
 159. Cha R, Brown WJ e Rybak MJ (2003). Bactericidal activities of daptomycin, quinupristin-dalfopristin, and linezolid against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(12):3960-3963.
 160. Saravolatz LD, Pawlak J, Johnson L, Bonilla H, Saravolatz II LD, Fakih MG et al (2012). *In vitro* activities of LTX-109, a synthetic antimicrobial peptide, against methicillin-resistant, vancomycin-intermediate, vancomycin-resistant, daptomycin-nonsusceptible, and linezolid nonsusceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(8):4478-4482.
 161. Fuda C, Heseck D, Lee M, Heilmayer W, Novak R, Vakulenko SB et al (2006). Mechanistic basis for the action of new cephalosporin antibiotics effective against methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry* 281(15):10035-10041.
 162. Zhanel GG, Voth D, Nichol K, Karlowsky JA, Noreddin AM e Hoban DJ (2009). Pharmacodynamic activity of ceftobiprole compared with vancomycin versus methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) using an *in vitro* model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(2):364-369.
 163. Saravolatz LD, Pawlak J, Johnson LB, Saravolatz II LD e Husain N (2010). *In vitro* activity of ceftobiprole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA), vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) and daptomycin-non-susceptible *S. aureus* (DNSSA). *International Journal of Antimicrobial Agents* 36(5):478-480.
 164. Zhanel GG, Rossnagel E, Nichol K, Cox L, Karlowsky JA, Zelenitsky S et al (2011). Ceftaroline pharmacodynamic activity versus community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, heteroresistant vancomycin-intermediate *S. aureus*, vancomycin-intermediate *S. aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus* using an *in vitro* model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(6):1301-1305.
 165. Farrell DJ, Flamm RK, Sader HS e Jones RN (2014). Activity of ceftobiprole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to daptomycin, linezolid or vancomycin, and

- strains with defined SCCmec types. *International Journal of Antimicrobial Agents* 43(4):323-327.
166. Belley A, McKay GA, Arhin FF, Sarmiento I, Beaulieu S, Fadhil I et al (2010). Oritavancin disrupts membrane integrity of *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci to effect rapid bacterial killing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(12):5369-5371.
 167. Barcia-Macay M, Lemaire S, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM e Van Bambeke F (2006). Evaluation of the extracellular and intracellular activities (human THP-1 macrophages) of telavancin versus vancomycin against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(6):1177-1184.
 168. Draghi DC, Benton BM, Krause KM, Thornsberry C, Pillar C e Sahm DF (2008). Comparative surveillance study of telavancin activity against recently collected Gram-positive clinical isolates from across the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(7):2383-2388.
 169. Arhin FF, Sarmiento I, Parr Jr TR e Moeck G (2009). Comparative *in vitro* activity of oritavancin against *Staphylococcus aureus* strains that are resistant, intermediate or heteroresistant to vancomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(4):868-870.
 170. Saravolatz LD, Pawlak J e Johnson LB (2010). *In vitro* activity of oritavancin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA), vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA), vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) and daptomycin-nonsusceptible *S. aureus* (DNSSA). *International Journal of Antimicrobial Agents* 36(1):69-72.
 171. Leuthner KD, Cheung CM e Rybak MJ (2006). Comparative activity of the new lipoglycopeptide telavancin in the presence and absence of serum against 50 glycopeptide non-susceptible staphylococci and three vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(2):338-343.
 172. Belley A, Neesham-Grenon E, Arhin FF, McKay GA, Parr TR e Moeck G (2008). Assessment by time-kill methodology of the synergistic effects of oritavancin in combination with other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(10):3820-3822.
 173. Baudoux P, Lemaire S, Denis O, Tulkens PM, Van Bambeke F e Glupczynski Y (2010). Activity of quinupristin/dalfopristin against extracellular and intracellular *Staphylococcus aureus* with various resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(6):1228-1236.
 174. Fox PM, Lampen RJ, Stumpf KF, Archer GL e Climo MW (2006). Successful therapy of experimental endocarditis caused by vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* with a combination of vancomycin and β -lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(9):2951-2956.
 175. Leuthner KD, Vidaillac C, Cheung CM e Rybak RJ (2010). *In vitro* activity of the new multivalent glycopeptide-cephalosporin antibiotic TD-1792 against vancomycin-nonsusceptible *Staphylococcus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(9):3799-3803.
 176. Fayaz AM, Girilal M, Mahdy SA, Somsundar SS e Venkatesan R (2011). Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: A different perspective for development of anti VRSA agents. *Process Biochemistry* 46(3):636-641.
 177. Miura K, Yamashiro H, Uotani K, Kojima S, Yutsudo K, Lu J et al (2010). Mode of action of Van-M-02, a novel glycopeptide inhibitor of peptidoglycan synthesis, in vancomycin-resistant bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(2):960-962.
 178. De Souza NJ, Gupte SV, Deshpande PK, Desai VN, Bhawsar SB, Yeole RD et al (2005). A chiral benzoquinolizine-2-carboxylic acid arginine salt active against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Chemistry* 48(16):5232-5242.
 179. Sunduru N, Gupta L, Chauhan K, Mishra NN, Shukla PK e Chauhan PMS (2011). Synthesis and antibacterial evaluation of novel 8-fluoro norfloxacin derivatives as potential probes for methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46(4):1232-1244.
 180. Brinch KS, Tulkens PM, Van Bambeke F, Frimodt-Møller N, Hoiby N e Kristensen HH (2010). Intracellular activity of the peptide antibiotic N22114: Studies with *Staphylococcus aureus* and human THP-1 monocytes, and comparison with daptomycin and vancomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(8):1720-1724.
 181. Miyoshi N, Isogai E, Hiramatsu K e Sasaki T (2017). Activity of tick antimicrobial peptide from *Ixodes persulcatus* (persulcatusin) against cell membranes of drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics* 70(2):142-146.
 182. Mohammad H, Mayhoub AS, Ghafoor A, Soofi M, Alajlouni RA, Cushman M et al (2014). Discovery and characterization of potent thiazoles versus methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Chemistry* 57(4):1609-1615.
 183. Mohammad H, Mayhoub AS, Cushman M e Seleem MN (2015). Antibiofilm activity and synergism of novel thiazole compounds with glycopeptide antibiotics against multidrug-resistant staphylococci. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* 68(4):259-266.
 184. Davis DC, Mohammad H, Kyei-Baffour K, Younis W, Creemer CN, Seleem MN et al (2015). Discovery and characterization of aryl isonitriles as a new class of compounds versus methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 101:384-390.
 185. Hasan A, Khan A, Sharmin T, Mazumder HH, Chowdhury AS (2016). Identification of putative drug targets in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) using computer aided protein data analysis. *Gene* 575(1):132-143.
 186. Gould IM (2010). VRSA—Doomsday superbug or damp squib?. *The Lancet* 10(12):816-818.
 187. Hiramatsu K, Cui L e Kuwahara-Arai K (2004). Has vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* started going it alone?. *The Lancet* 364(9434):565-566.

Resistência total à vancomicina em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* tipo-VanA: Uma revisão de 2016

Vasco Antunes de Oliveira Tiago

ERRATA

Na Página	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
2	19	those not indexed	the original papers not indexed
10	31	duas na Pensilvânia e duas em Nova Iorque	duas na Pensilvânia ou Texas e duas presumivelmente em Nova Iorque ou Maryland
12	Legenda da Tabela 1, linha 5	Variante de <i>locus</i> único de CC5	Variante de <i>locus</i> único de ST5
13	Tabela 1, linha 12 (VRS10)	Plasmídeo enterocócico	Plasmídeo enterocócico, Inc18-tipo
13	Tabela 1, linha 20 (STM2)	Prototípico	Análogo ao prototípico, sequência parcialmente homóloga
15	9	reportaram a utilização de 3 estirpes VRSA clinicamente isoladas no Centro Médico de Hershey num estudo.	reportaram a utilização num estudo de 3 estirpes VRSA isoladas no Centro Médico de Hershey ou no Centro Médico da Universidade do Texas Sudoeste em Dallas (os autores não especificam a localização de cada estirpe).
15	11	neste centro médico já tinha sido isolada uma estirpe em 2002, isto significa que foram isoladas	no Centro Médico de Hershey já tinha sido isolada uma estirpe em 2002, isto significa que podem ter sido isoladas
15	13-14	Embora não seja directamente divulgada, Nova Iorque é a localização mais provável.	Embora não sejam directamente divulgadas, Rockville (Maryland) ou Hempstead (Nova Iorque) são as localizações mais prováveis.
20	8	que é depois incorporado no peptidoglicano pela ligase VanA	que é depois acoplado a D-ala pela ligase VanA
20	25	precursor tetrapeptídico com terminal D-lys-D-ala	precursor tetrapeptídico com terminal L-lys-D-ala
25	28-29	também se encontrou um elemento Tn1546 prototípico	encontrou-se um elemento Tn1546 análogo ao prototípico, com sequência parcialmente homóloga
40	Referência 142	Zhu W, Clark N e Patel JB (2012)	Zhu W, Clark N e Patel JB (2013)